Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale,, n. 87 del 13 aprile 2000 - Serie generale

Spediz. abb. post. 45% - art. 2, comma 20/b
Legge 23-12-1996, n. 662 - Filiale di Roma

GAZZETTA UFFICIALE
DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA **Roma - Giovedì, 13 aprile 2000** SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 60

MINISTERO DELLE POLITICHE
AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO MINISTERIALE 23 marzo 2000.

Approvazione dei «Metodi ufficiali di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico».

SOMMARIO

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

DECRETO 23 marzo 2000.

Approvazione dei «Metodi ufficiali di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico».

IL MINISTRO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI

Visti i decreti ministeriali 7 luglio 1990, n. 15517, 20 settembre 1990, n. 20611 e 3 gennaio 1996, n. 10001, con i quali è stato istituito e ricostituito il Comitato tecnico scientifico per l'Osservatorio nazionale pedologico e per la qualità del suolo, con funzioni di consulenza e proposizione all'Amministrazione centrale dell'agricoltura ed alle regioni e province autonome di iniziative in materia pedologica, tra l'altro in tema di standardizzazione di metodi di analisi del suolo;

Vista la delibera 10 maggio 1995, con cui il Comitato interministeriale per la programmazione economica ha approvato il Programma nazionale dei servizi di sviluppo agricolo, nel quale al punto 82 si fa esplicito riferimento, tra i servizi tecnici di supporto, all'attività ed alle iniziative per il suolo dell'Osservatorio nazionale pedologico;

Vista la legge 15 marzo 1997, n. 59, recante delega del Governo per il conferimento di funzioni e compiti alle regioni ed enti locali, per la riforma della pubblica amministrazione e per la semplificazione amministrativa;

Visto il decreto legislativo 4 giugno 1997, n. 143, recante conferimento alle regioni delle funzioni amministrative in materia di agricoltura e pesca e riorganizzazione dell'Amministrazione centrale;

Visto in particolare l'art. 2, comma 2 della legge predetta, laddove si stabilisce che il Ministero per le politiche agricole svolga, tra l'altro, compiti di disciplina generale e coordinamento nazionale in diverse materie, tra le quali la tutela della qualità dei prodotti agroalimentari, caratteristica dipendente in buona parte dalle condizioni di gestione del suolo e delle acque;

Vista la Convenzione delle Nazioni unite per la lotta contro la desertificazione negoziata nel 1994 in seguito alle raccomandazioni della Conferenza delle Nazioni unite tenuta a Rio de Janeiro nel 1992, Convenzione che, ratificata dall'Italia con legge 4 giugno 1997, n. 170, riflettendo il capitolo 12 dell'Agenda 21 dedica una diffusa e particolare attenzione alle problematiche di conoscenza, difesa e salvaguardia del suolo e delle acque;

Visto il regolamento (CE) 1257/1999 del Consiglio sul sostegno comunitario allo sviluppo rurale sostenibile, che in particolare per le misure agroambientali è inteso a promuovere forme di conduzione dei terreni agricoli compatibili con la tutela e con il miglioramento delle diverse componenti ambientali;

Visto il decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152, recante disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole;

Visti i decreti ministeriali 11 maggio 1992, e 13 settembre 1999, con i quali sono stati approvati, riapprovati e resi ufficiali i Metodi di analisi chimica del suolo;

Visto il decreto ministeriale 1° agosto 1997 con il quale sono stati approvati e resi ufficiali i Metodi di analisi fisica del suolo;

Considerato che per una valida politica nazionale di programmazione dell'uso delle acque a fini agricoli e zootecnici va perseguita una approfondita conoscenza della qualità delle stesse nei suoi vari aspetti, e che a tal fine occorre, tra l'altro, meglio definire i metodi di analisi chimica, nonché acquisire vantaggiosamente nell'ambito nazionale metodi già definiti in ambito internazionale da istituzioni di normalizzazione come ISO e CEN;

Considerato che l'Istituto sperimentale per la nutrizione delle piante, organismo scientifico specialistico del Ministero per le politiche agricole, nell'ambito delle iniziative del Comitato tecnico scientifico per l'Osservatorio nazionale pedologico ha definito gli accennati metodi di analisi delle acque giovandosi di diverse collaborazioni esterne, in particolare della Società italiana per la scienza del suolo e dell'Istituto di ricerca sulle acque del Consiglio nazionale delle ricerche;

Considerato che il Comitato tecnico scientifico sopra richiamato ha espresso parere positivo sui medesimi metodi nella riunione del 9 novembre 1999;

Ritenuto opportuno approvare e rendere ufficiali i metodi medesimi perché ne sia consentita la più diffusa utilizzazione nel territorio nazionale;

Decreta:

Art. 1.

1. Al fine di disporre di metodi di conoscenza standardizzati delle acque utilizzabili per gli scopi di cui alle premesse, sono approvati e resi ufficiali i Metodi di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico di cui all'allegato 1 annesso al presente decreto, che ne costituisce parte integrante.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 23 marzo 2000

Il Ministro: De Castro

ALLEGATO 1

PARAMETRI GENERALI

CAMPIONAMENTO

1. Introduzione

L'analisi inizia con il campionamento, che riveste primaria importanza poiché esso influenza i risultati di tutte le operazioni successive, trasferendo in essi eventuali errori, e quindi togliendo ad essi l'attendibilità. Il campionamento deve essere effettuato da personale qualificato ed opportunamente addestrato. Il personale addetto al campionamento deve agire sotto la responsabilità di un esperto, il quale, a sua volta, deve conoscere la natura ed il tipo di corpo idrico dal quale proviene l'acqua da analizzare. Viene lasciata alla responsabilità dell'esperto la scelta del metodo di campionamento.

2. Tipi di campionamento

Risulta relativamente complicato standardizzare la metodica di prelievo, essendo alquanto variabile la fonte dell'acqua da analizzare. Requisito primario è che il campione sia rappresentativo del corpo idrico dal quale l'acqua è prelevata. In ogni caso si possono definire alcune tipologie di prelevamento:

- *campionamento istantaneo*: adatto per acque a composizione relativamente costante. Per campionamento istantaneo s'intende un campione singolo prelevato in un'unica soluzione in un punto determinato ed in un tempo molto breve;
- *campionamento medio*: adatto per acque di composizione variabile. Per campione medio s'intende un campione ottenuto da più prelievi effettuati in un dato intervallo di tempo, in maniera continua o discontinua, proporzionale o non alla portata del corpo idrico. La durata del campionamento, del numero di prelievi e le loro frequenze saranno scelte in relazione alla variabilità della composizione delle acque;
- *campionamento medio-composito*: viene realizzato mescolando un numero di campioni istantanei prelevati ad opportuni intervalli di tempo, in misura proporzionale o non alla portata;
- *campionamento medio-continuo*: viene effettuato prelevando in maniera continua e per un dato intervallo di tempo una quantità proporzionale o non alla portata.

Per corpi idrici come canali e fiumi risulta più corretto il campionamento medio, medio-composito, medio-continuo.

Per corpi idrici stagnanti come vasche di accumulo o corpi idrici a composizione relativamente variabile (falde), risulta più idoneo il campionamento istantaneo.

Nel caso di impianto di irrigazione fisso o di sollevamento, sarà opportuno prelevare vicino alla bocca d'entrata o sotto il pelo dell'acqua. Può essere utile, qualora vi siano filtri o desalificatori, effettuare un controllo analitico delle acque in uscita dall'impianto.

Come quantità totale, si consiglia di prelevare quantità di campione in eccesso rispetto a quello necessario, che sarà in funzione delle determinazioni da eseguire. Inoltre, si consiglia di distribuire il campione in più contenitori, evitando così la possibilità di perdita del campione per eventuali incidenti, e mantenendo la possibilità di effettuare ulteriori accertamenti che possano essere ritenuti necessari.

3. Conservazione del campione

Conservare un campione significa garantire la stabilità e l'inalterabilità di tutti i suoi costituenti nell'intervallo di tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi. Tale condizione non potrà mai essere realizzata totalmente, ma è possibile ricorrere ad accorgimenti che permettono di ridurre al minimo le alterazioni, salvaguardando la rappresentatività del campione.

A tale scopo si adotteranno contenitori di materiale scelto in funzione del parametro da determinare, che garantiscano la perfetta chiusura nel caso che siano in gioco componenti volatili.

La precipitazione dei metalli come idrossidi, l'adsorbimento dei metalli sulle superfici del contenitore, la formazione di complessi, la variazione dello stato di valenza di alcuni elementi per ossidoriduzione,

potranno essere ritardati per addizione di stabilizzanti chimici. L'attività microbica, a cui è imputabile l'alterazione di alcuni parametri analitici come il COD, il fosforo e l'azoto organici, potrà essere ritardata mediante l'aggiunta di battericidi e/o ricorrendo alla refrigerazione.
I contenitori utilizzati per la raccolta ed il trasporto dei campioni non devono alterare, a contatto con il campione, il valore di quei parametri di cui deve essere effettuata la determinazione. A questo proposito, devono soddisfare i seguenti requisiti:
- non devono cedere o adsorbire sostanze, alterando la composizione del campione;
- devono essere resistenti ai vari costituenti presenti nel campione;
- devono garantire la perfetta tenuta sia per i gas disciolti che per elementi volatili.

I materiali più usati per i contenitori sono:
- il vetro
- la plastica (polietilene o polipropilene)
- altri materiali

Il vetro è il materiale da preferire, ed esistono in commercio il vetro Pyrex (borosilicato) e il vetro Vycor (ad alto contenuto di silicio), che è migliore ma ha un costo più elevato. La plastica ha il vantaggio di essere leggera, resistente all'urto ed economica. D'altra parte ha lo svantaggio di avere una sensibile permeabilità ai gas e di rilasciare additivi organici (per esempio plastificanti). Vanno anche segnalati contenitori in altri materiali polimerici quali il policarbonato (soprattutto per campioni contenenti metalli), il teflon, il cloruro di polivinile e il polimetilpentene (TPX).
Nella Tabella 1 vengono raccomandati i contenitori, i principali conservanti, i procedimenti più adatti per la migliore conservazione del campione ed il tempo massimo consigliato intercorrente tra il momento del prelievo a quello dell'analisi.

Bibliografia

CNR - IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*. Quaderno 100 (Roma).

Tabella 1 - Raccomandazioni per la conservazione dei campioni di acque nel periodo che intercorre tra il prelievo e l'analisi

Parametro	Contenitore consigliato	Procedimento di stabilizzazione	Intervallo tra prelievo e analisi
Alluminio	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Azoto ammoniacale	Polietilene o vetro	40 mg L^{-1} $HgCl_2$ Refrigerazione a 4°C	24 ore
Azoto nitrico	Polietilene o vetro	40 mg L^{-1} $HgCl_2$ Refrigerazione a 4°C	24 ore
Azoto nitroso	Polietilene o vetro	40 mg L^{-1} $HgCl_2$ Refrigerazione a 4°C	24 ore
Azoto organico	Vetro	40 mg L^{-1} $HgCl_2$ Refrigerazione a 4°C	24 ore
BOD	Vetro	Refrigerazione a 4°C	24 ore
Boro	Polietilene	5 mL L^{-1} HNO_3 1:1	1 settimana
Cadmio	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Calcio	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Carbonati-bicarbonati	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Carbonio organico	Vetro	2 mL L^{-1} H_2SO_4 conc.	1 settimana
Cianuri	Polietilene	pH 11 con NaOH 10% Refrigerazione a 4°C	24 ore
Cloro	Vetro scuro	pH 11 con NaOH 10% Refrigerazione a 4°C	12 ore
Cloruri	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Cobalto	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
COD	Vetro	Refrigerazione a 4°C	6 ore
Conducibilità elettrica	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Cromo	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Durezza	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Ferro	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Fluoruri	Polietilene	Refrigerazione a 4°C	1 settimana
Fosforo	Vetro o polietilene	pH 1÷2 con HCl conc. Refrigerazione a 4°C	1 settimana
Magnesio	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Manganese	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Molibdeno	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Nichel	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Ossigeno disciolto	Vetro	Solfato manganoso 2 mL + Ioduro-sodio azide 2 mL L^{-1}	24 ore
Piombo	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Potassio	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Rame	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi
Reazione	Polietilene o vetro	Refrigerazione a 4°C	24 ore
Sali totali disciolti	Polietilene o vetro	Non necessario	24 ore
Silice	Polietilene	Filtrare sul posto e refrigerazione a 4°C	1 settimana
Potassio	Polietilene o vetro	Non necessario	1 settimana
Solfati	Polietilene o vetro	5 mL L^{-1} CH_3COOH + 5 mL L^{-1} formaldeide 40%	1 settimana
Solfuri	Polietilene	2 mL L^{-1} zinco acetato 2N e 2 mL L^{-1} NaOH 1 N	24 ore
Solidi totali sospesi	Polietilene o vetro	Non necessario	24 ore
Zinco	Polietilene	3 mL L^{-1} HNO_3 1:1	6 mesi

CLORO

1. Determinazione colorimetrica

1.1. Principio del metodo

Il cloro può essere determinato quantitativamente con procedimento colorimetrico, basato sulla formazione di un composto colorato tra cloro e N,N-dietil-p-fenilendiammina (DPD), mediante dosaggio spettrofotometrico alla lunghezza d'onda di 510 nm.
Operando con 100 mL di campione, il metodo è applicabile alle acque naturali, di scarico e potabili a concentrazioni comprese tra 0,03 e 5 mg L^{-1} o superiori, previa opportuna diluizione del campione.

1.2. Interferenze e cause di errore

La reazione colorimetrica deve essere condotta a temperatura ambiente; temperature elevate facilitano l'idrolisi delle cloroammine con apparente aumento della concentrazione di cloro libero.
Il controllo del pH riveste un'importanza fondamentale; bassi valori di pH impediscono la differenziazione tra cloro libero e monocloroammina e tra monocloroammma e dicloroammmina, mentre valori elevati favoriscono reazioni con l'ossigeno.
L'ossigeno disciolto interferisce in concentrazioni superiori a 10 mg L^{-1}; interferiscono inoltre i composti clorurati ad azione ossidante come il diossido di cloro e composti ossidanti a medio ed alto potenziale di ossidazione quali ozono, acqua ossigenata, cromati, bromo, iodio, bromoammine e iodoammine.
Il manganese allo stato ossidato interferisce, ma la sua interferenza può essere corretta conducendo una misura preliminare in presenza di arsenito di sodio.
Le interferenze di ferro(III) e rame(II) fino a 10÷20 mg L^{-1} possono essere mascherate aggiungendo sequestranti tipo EDTA alla soluzione tampone o a quella del reagente DPD.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro per misure a 510 nm dotato di celle con cammino ottico da 1 a 10 cm.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere distillata ed esente da sostanze ossidanti o riducenti. L'assenza di tali sostanze può essere verificata con i seguenti saggi:

- il campione addizionato con 1 g di ioduro dì potassio e 5 mL di soluzione di DPD deve restare incolore;
- il campione con qualche goccia di ipoclorito, con aggiunta dei reattivi dopo qualche minuto deve assumere una colorazione rosa.

Sale sodico diidrato dell'acido etilendiamminotetracetico (EDTA).

Soluzione tampone (pH 6,5). Sciogliere 24 g di fosfato bisodico [Na_2PO_4] e 46 g di fosfato monopotassico [KH_2PO_4] in acqua, aggiungere 100 mL di acqua in cui sono stati sciolti 0,8 g di sale disodico dell'acido etilendiamminotetracetico [EDTA] e diluire il tutto a 1.000 mL con acqua. La soluzione deve essere conservata in frigorifero per evitare che lo sviluppo di muffe provochi interferenze nella determinazione.

Soluzione di acido solforico (1+3): Aggiungere lentamente 25 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84) a 50 mL di acqua. Dopo raffreddamento, diluire a 100 mL con acqua.

Soluzione di N,N-dietil-p-fenilendiammina (DPD): Sciogliere 1,5 g di N,N-dietil-p-fenilendiammina solfato pentaidrato in acqua insieme a 8 mL di acido solforico (1+3) e 200 mg di EDTA. Diluire a 1.000 mL con acqua. Conservare la soluzione in bottiglia di vetro scuro e scartare le soluzioni eventualmente colorate.

Ioduro di potassio in cristalli [KI].
Ioduro di potassio (1 g L^{-1}): Sciogliere 100 mg di ioduro di potassio [KI] in 100 mL di acqua. Conservare la soluzione in bottiglia di vetro scura preferibilmente in frigorifero; scartare la soluzione quando si sviluppa un colore giallo.
Acido acetico glaciale [CH_3COOH] (d=1,05).
Soluzione titolata di tiosolfatoto di sodio 0, 01 N.
Indicatore salda d'amido: Stemperare in un mortaio 5÷6 g di amido con alcuni mL di acqua fredda. Versare la pasta risultante in 1.000 mL di acqua bollente. Lasciar depositare una notte e utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo per ogni litro di soluzione circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.
Soluzione di ipoclorito di sodio (0,1 g L^{-1} di cloro): Diluire opportunamente al momento dell'uso una soluzione commerciale a titolo noto.
Effettuare il controllo del titolo nel seguente modo: introdurre 2 mL di acido acetico glaciale in una beuta contenente 25 mL di acqua; aggiungere circa 1 g di ioduro di potassio e 50 mL della soluzione di ipoclorito. Miscelare accuratamente e titolare con la soluzione di tiosolfato di sodio 0,01 N fino ad ottenere un colore giallo paglierino; aggiungere quindi 2 mL di soluzione di salda d'amido e continuare a titolare fino a completa decolorazione della soluzione.
Per risalire alla concentratone di cloro attivo nella soluzione in esame applicare la seguente formula:

$$\text{Cloro (mg } L^{-1}) = \frac{a \cdot N \cdot 35{,}45}{V} \cdot 1000$$

dove:
a = volume (mL) di soluzione di tiosolfato di sodio impiegato per la titolazione del campione;
N = normalità del tiosolfato di sodio;
V = volume (mL) di campione prelevato

La soluzione va controllata settimanalmente.
Soluzione di arsenito di sodio. Sciogliere 500 mg di arsenito di sodio [$NaAsO_2$] in acqua distillata e portare il volume a 100 mL.
Soluzione concentrata di permanganato di potassio: Sciogliere 0,891 g di permanganato di potassio [$KMnO_4$] in un matraccio tarato da 1.000 mL e portare a volume con acqua.
Soluzione diluita di permanganato di potassio: Introdurre 10 mL della soluzione concentrata di permanganato di potassio in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua. Quando 1 mL di questa soluzione viene diluito a 100 mL con acqua viene prodotto un colore uguale a quello di 1 mg L^{-1} di cloro che abbia reagito con il reattivo DPD.

1.5. Procedimento

1.5.1. Calibrazione con soluzione di ipoclorito

Preparare una serie di standard di cloro con concentrazioni comprese tra 0,05 e 4 mg L^{-1} di cloro diluendo i necessari volumi della soluzione di ipoclorito con acqua in matracci da 100 mL. In altrettante beute porre 5 mL della soluzione tampone (pH 6,5) e 5 mL della soluzione di DPD; entro 1 minuto dalla miscelazione trasferirvi il contenuto dei matracci tarati da 100 mL. Agitare e, a colore sviluppato, misurare entro due minuti l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm.
Tracciare la curva di calibrazione riportando in ascissa le concentrazioni del cloro e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza, corretti del valore del bianco. Controllare un punto della curva di calibrazione giornalmente e rifare la curva stessa ogniqualvolta viene ripreparata la soluzione di DPD.

1.5.2. Calibrazione con soluzione di permanganato di potassio
Preparare una serie di standard di permanganato di potassio compresi nell'intervallo 0,05÷4 mg L^{-1} di cloro diluendo i necessari volumi della soluzione diluita di permanganato di potassio in matracci da 100 mL. In altrettante beute porre 5 mL della soluzione tampone (pH 6,5) e 5 mL della soluzione di DPD; entro 1 minuto dalla miscelazione trasferirvi il contenuto dei matracci tarati da 100 mL. Agitare e, a colore sviluppato, misurare entro due minuti l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm.
Tracciare la curva di calibrazione riportando in ascissa le concentrazioni del cloro e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza, corretti del valore del bianco. Controllare un punto della curva di calibrazione giornalmente e rifare la curva stessa ogniqualvolta viene ripreparata la soluzione di DPD.

1.5.3. Dosaggio del Cloro libero
Si consiglia di utilizzare vetreria differente per la determinazione del cloro libero per evitare contaminazioni da parte dello ioduro di potassio.
In una beuta da 250 mL, contenente 5 mL di soluzione tampone (pH 6,5) e 5 mL di soluzione di DPD, trasferire entro 1 minuto 100 mL di campione o una sua aliquota diluita a 100 mL con acqua. Agitare e misurare subito l'assorbanza nelle stesse condizioni utilizzate per la calibrazione. Controllare che il pH della soluzione di misura sia compreso tra 6,2 e 6,5; in caso contrario aumentare l'aggiunta di tampone. Ricavare dalla curva di calibrazione la concentratone C_1. Con questo dosaggio viene determinato il cloro dovuto all'acido ipocloroso, allo ione ipoclorito e al cloro molecolare presente.

1.5.4. Dosaggio del Cloro totale
In una beuta da 250 mL, contenente 5 mL di soluzione tampone (pH 6,5) e 5 mL di soluzione di DPD, trasferire entro 1 minuto 100 mL di campione o una sua aliquota diluita a 100 mL con acqua. Aggiungere quindi 1 g di ioduro di potassio, agitare e dopo due minuti esatti misurare l'assorbanza a 510 nm. Ricavare dalla curva di calibrazione la concentrazione C_2.

1.5.5. Correzione dell'interferenza del manganese
Se è presente manganese allo stato ossidato, prelevare 100 mL di campione o una sua aliquota diluita a 100 mL e porli in una beuta da 250 mL. Aggiungere 1 mL di arsenito di sodio e mescolare. Aggiungere quindi 5 mL di soluzione tampone (pH 6,5) e 5 mL di soluzione di DPD. Agitare e misurare l'assorbanza a 510 nm.
Ricavare dalla curva di calibrazione la concentrazione C_3 dovuta all'interferenza del manganese.

1.6. Espressione dei risultati
La concentrazione in cloro libero e totale viene ricavata dalle formule:

$$\text{Cloro libero (mg L}^{-1}) = C_1 - C_3$$
$$\text{Cloro totale (mg L}^{-1}) = C_2 - C_3$$

1.7. Precisione ed accuratezza
I dati di precisione ed accuratezza non risultano al momento disponibili.

Bibliografia
CNR–IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).
ISO (1985), *Determination of free chlorine and total chlorine- Part 2: colorimetric method using N,N-diethyl-p-phenylenediamine, for routine control purpose.* ISO/TC 147 Water Quality, DP 7393/2

CONDUCIBILITÀ ELETTRICA

1. Determinazione conduttimetrica

1.1. Principio del metodo

Per conducibilità elettrica specifica s'intende la conducibilità elettrica di 1 mL di soluzione misurata, ad una determinata temperatura, fra due elettrodi a facce piane parallele aventi la superficie di 1 cm^2.
La conducibilità elettrica viene determinata misurando la conducibilità elettrica del campione di acqua, confrontata con quella di una soluzione standard di KCl la cui conducibilità, alla stessa temperatura, è nota.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, potabili, di scarico e marine.

1.2. Interferenze e cause d'errore

La conducibilità fornisce una misura sia globale che relativa della concentrazione delle specie ioniche presenti in soluzione.
Possono essere causa d'errore la presenza nel campione di sostanze in sospensione, come oli, grassi e colloidi, in quantità tali da ricoprire la superficie degli elettrodi.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Cella di conduttività specifica contenente elettrodi platinati, del tipo a pipetta o ad immersione. La scelta della cella dipende dall'intervallo di conducibilità specifica previsto. Una costante di cella di 0,1 è adatta per soluzioni di bassa conducibilità, 100 dS m^{-1} o meno; una costante di cella di 1 per soluzioni di moderata conducibilità; una costante di cella di 10 per soluzioni altamente conducenti. Celle nuove dovranno essere pulite con soluzioni di acido solforico-cromico, e gli elettrodi platinati prima dell'uso. In seguito, gli elettrodi dovranno essere puliti e riplatinati ogni qual volta che le letture non siano più riproducibili, oppure quando un'ispezione rivela una perdita di nero di platino dalla superficie dell'elettrodo. Per riplatinare, preparare una soluzione contenente 1 g di cloruro di platino [$PtCl_2$] e 0,012 g di acetato di piombo [$Pb(CH_3COO)_2$] in 100 mL di acqua. Immergere gli elettrodi nella soluzione così preparata, e far passare corrente da una batteria da 1,5 V attraverso la cella. La quantità di corrente dovrebbe essere tale che solo una piccola quantità di gas viene evoluto, e la direzione della corrente dovrebbe essere occasionalmente invertita.

1.4. Reattivi

Soluzione standard di cloruro di potassio [KCl] 0,01 moli L^{-1}. Sciogliere, a 25 °C, 0,7436 g di KCl anidro in 1.000 mL di acqua bidistillata. Questa è la soluzione standard di riferimento, che a 25 °C ha una conduttività specifica di 1,408 dS m^{-1}.

1.5. Procedimento

1.5.1. Determinazione della costante di cella

Sebbene per misure di routine si possa usare il valore riportato dal certificato di taratura della cella stessa, per determinazioni più accurate conviene determinare ogni volta la costante della cella.
Per la verifica della costante della cella procedere in questo modo:

- Determinare la conducibilità dell'acqua usata per la soluzione standard di KCl utilizzando il valore della cella fornito dal costruttore.
- Determinare la conducibilità della soluzione standard di cloruro di potassio 0,01 moli L^{-1}

Ricavare la costante di cella (dS m^{-1}) dalla formula:

$$J = \frac{K_1 + K_2}{Cs}$$

dove:

K_1 = conducibilità specifica della soluzione standard di KCl (1,408 dS m^{-1});
K_2 = conducibilità specifica (dS m^{-1}) dell'acqua usata per la preparazione della soluzione standard;
Cs = conducibilità (dS m^{-1}) misurata della soluzione.

1.5.2. Misura
Con la cella di conducibilità, preventivamente lavata con acqua distillata ed asciugata, procedere alla determinazione diretta della conducibilità Cx in dS m^{-1}.
Effettuare le misure, comprese quelle per la determinazione della costante di cella, a temperatura costante ed entro l'intervallo di 20÷30 °C.

1.6. Espressione dei risultati
La conducibilità specifica ECt (dS m^{-1}) del campione di acqua è uguale alla costante di cella J, moltiplicato la conducibilità del campione, Cx:

$$ECt = J \cdot Cx$$

Riportare i risultati a 25 °C. Se la temperatura delle varie misure non è esattamente 25 °C, riportare le misure effettuate a 25 °C utilizzando il fattore correttivo ricavato dalla Tabella 1:

$$ECw = ECt \cdot ft$$

La conducibilità specifica si esprime dS m^{-1}, tuttavia, poiché in molti casi la conducibilità specifica dell'acqua è molto bassa è preferibile esprimerla in µ.S cm^{-1} (1 dS m^{-1} = 1.000 µS cm^{-1}).

Tabella 1 - Fattore di temperatura (ft) per riportare le misure di conducibilità specifica alla temperatura standard di 25 °C.

°C	ft	°C	ft	°C	Ft	°C	ft
20,0	1,112	*22,6*	1,051	*25,0*	1,000	*27,6*	0,950
20,2	1,107	*22,8*	1,047	*25,2*	0,996	*27,8*	0,947
20,4	1,102	*23,0*	1,043	*25,4*	0,992	*28,0*	0,943
20,6	1,097	*23,2*	1,038	*25,6*	0,988	*28,2*	0,940
20,8	1,092	*23,4*	1,034	*25,8*	0,983	*28,4*	0,936
21,0	1,087	*23,6*	1,029	*26,0*	0,979	*28,6*	0,932
21,2	1,082	*23,8*	1,025	*26,2*	0,975	*28,8*	0,929
21,4	1,078	*24,0*	1,020	*26,4*	0,971	*29,0*	0,925
21,6	1,073	*24,2*	1,016	*26,6*	0,967	*29,2*	0,921
21,8	1,068	*24,4*	1,012	*26,8*	0,964	*29,4*	0,918
22,0	1,064	*24,6*	1,008	*27,0*	0,960	*29,6*	0,914
22,2	1,060	*24,8*	1,004	*27,2*	0,956	*29,8*	0,911
22,4	1,055	*25,0*	1,000	*27,4*	0,953	*30,0*	0,907

1.7. Precisione ed accuratezza
La precisione e l'accuratezza con cui la conducibilità specifica dell'acqua può essere determinata dipende dallo strumento usato.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1975), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* XIV ed. (Washington, APHA).

DUREZZA

1. Generale

Per durezza di un'acqua si intende la quantità di cationi multivalenti in essa contenuti; poiché i cationi multivalenti presenti in quantità rilevante sono generalmente ioni Ca^{++} e Mg^{++}, col termine durezza si indica in senso restrittivo la loro concentrazione.
La durezza viene normalmente distinta in:

- Durezza totale: somma delle concentrazioni degli ioni calcio e magnesio: (Ca^{++}+ Mg^{++} in mg L^{-1}).
- Durezza calcica: concentrazione dello ione calcio: (Ca^{++} in mg L^{-1}).
- Durezza magnesiaca: concentrazione in ione magnesio: (Ca^{++}+ Mg^{++} in mg L^{-1}) – (Ca^{++} in mg L^{-1}).
- Durezza alcalina (o carbonatica): durezza corrispondente ai bicarbonati, carbonati e idrossidi.
- Durezza non alcalina (o non carbonatica): differenza fra la durezza totale e la durezza alcalina.

Sono in progressivo disuso i risultati espressi in gradi francesi o in gradi tedeschi:

1 grado francese = 10 mg L^{-1} come $CaCO_3$.
1 grado tedesco = 10 mg L^{-1} come CaCO.

2. Durezza totale

2.1. Principio del metodo

La durezza totale si determina mediante complessazione con l'acido etilendiamino tetraacetico (EDTA), operando su un campione di acqua tamponato a pH 10 in presenza di nero eriocromo T, usato come indicatore.
Una soluzione contenente Ca^{++} e Mg^{++} acquista in queste condizioni un colore rosso vino; quando tutto il calcio ed il magnesio sono stati complessati dall'EDTA la soluzione passa dal colore rosso vino al blu; questo è il punto finale della titolazione che permette il dosaggio totale degli ioni calcio e magnesio (durezza totale).
Il metodo è applicabile alle acque naturali, in particolare a quelle adibite ad uso potabile ed industriale.

2.2. Interferenze e cause di errore

La determinazione chelometrica non può essere impiegata per acque fortemente colorate in quanto il viraggio dell'indicatore in tali condizioni può risultare mascherato.
Anche sospensioni o sostanze organiche colloidali possono interferire, in quanto alterano il viraggio dell'indicatore. In questo caso il campione è portato a secchezza su bagno ad acqua e calcinato in muffola a 600 °C fino a completa distruzione della sostanza organica. Il residuo è ripreso con 20 mL di HCl 1 N, neutralizzato a pH 7 con NaOH 1 N e portato a 50 mL con acqua distillata. Raffreddato a temperatura ambiente, viene titolato.
Molti ioni metallici interferiscono nella determinazione, sia perché vengono anch'essi titolati dall'EDTA, sia perché possono mascherare il punto finale. Tali interferenze possono essere eliminate per aggiunta, prima della titolazione con EDTA, di additivi che hanno lo scopo di precipitare o di complessare i vari ioni interferenti. Nella Tabella 1 sono riportate le concentrazioni massime (in mg L^{-1}) delle sostanze interferenti che possono essere presenti nel campione originale, usando i vari additivi indicati, senza inficiare il risultato dell'analisi stessa.

2.3. Apparecchiature

- Normale attrezzatura di laboratorio.
- Buretta da 25 mL al decimo di mL.
- Capsula di porcellana da 250 mL.

Tabella 1 - Concentrazioni massime delle sostanze interferenti che non inficiano i risultati delle analisi utilizzando gli additivi indicati.

Specie chimica	Additivo I	Additivo II	Additivo III
Al^{3+}	20	20	20
Ba^{2+}	*	*	*
Cd^{2+}	*	20	*
Co^{2+}	20	0,3	0
Cu^{2+}	30	20	0,3
Fe^{3+}	30	5	20
Pb^{2+}	*	20	*
Mn^{2+}	*	1	1
Ni^{2+}	20	0,3	0
Sn^{2+}	*	*	*
Zn^{2+}	*	200	*
Polifosfati		10	

Il segno * a fianco delle varie specie indica che anche in presenza degli inibitori queste specie vengono titolate con EDTA e che la loro concentrazione contribuisce alla durezza

2.4. Reattivi

Soluzioni tampone I. Sciogliere 16,9 g di cloruro di ammonio [NH_4Cl] in 143 mL di idrossido d'ammonio [NH_4OH] concentrato e aggiungere 1,25 g del sale di Mg dell'EDTA. Diluire a 250 mL con acqua distillata.

Soluzione tampone II. Sciogliere 1,179 g di sale bisodico dell'EDTA e 0,78 g di solfato di magnesio eptaidrato [$MgS0_4 \bullet 7H_2O$] (o 0,644 g di cloruro di magnesio esaidrato [$MgCl_2 \bullet 6H_2O$]) in 50 mL di H_2O. Aggiungere 16,9 g di cloruro d'ammonio [NH_4Cl] e 143 mL di idrossido d'ammonio [NH_4OH] concentrato Diluire a 250 mL con H_2O. Conservare in bottiglia di politene ben chiusa per impedire la volatilizzazione di NH_3 e la carbonatazione.

Additivo I. Aggiungere 0,25 g di cianuro di potassio [KCN] in polvere alla soluzione da titolare **(Il KCN è sostanza estremamente tossica)**.

Additivo II. Sciogliere 5 g di solfuro di sodio nonaidrato [$Na_2S \bullet 9H_2O$] o 3,7 g di solfuro di sodio pentaidrato [$Na_2S \bullet 5H_2O$] in 100 mL di acqua distillata; la soluzione deve essere conservata fuori dal contatto dell'aria poiché il solfuro si ossida all'aria. Nel procedimento impiegare 1 mL di questo additivo.

Additivo III. Sciogliere 4,5 g di cloruro di idrossilammina in 100 mL di alcool etilico al 95% (o alcool isopropilico). Questo additivo è aggiunto alla soluzione del colorante e la soluzione risultante funziona sia da indicatore del punto finale della titolazione che da additivo degli ioni interferenti.

Indicatore nero eriocromo T. Aggiungere 1 mL di una soluzione (30 g L^{-1}) di carbonato di sodio [Na_2CO_3] a 30 mL di H_2O e quindi 1 g di nero eriocromo T. Aggiustare il pH a 10,5 con la soluzione di carbonato di sodio e portare la soluzione a 100 mL con alcool etilico al 95% (o alcool isopropilico). La soluzione viene conservata in bottiglia scura ben tappata per ridurre i deterioramenti dovuti all'aria e alla luce.

Soluzione di carbonato di sodio (30 g L^{-1}). Sciogliere 30 g di carbonato di sodio [Na_2CO_3] in acqua e diluire a 1.000 mL.

Etilendiammino tetraacetato di sodio (EDTA). Sciogliere 4 g del sale biidrato in 800 mL di acqua. Determinare il titolo della soluzione così ottenuta con una di cloruro di calcio [$CaCl_2$] a titolo noto; aggiustare il volume della soluzione in modo che 1 mL corrisponda a 0,4 mg di Ca^{++}. Conservare la soluzione in bottiglia di politene e determinare il titolo esatto periodicamente.

Soluzione di cloruro di calcio [$CaCl_2$]. Sciogliere 1.000 g di carbonato di calcio [$CaCO_3$] in HCl (1:4) aggiunto molto lentamente. Quando tutto il sale si è sciolto, evaporare fino a secchezza. Ripetere il trattamento fino alla totale eliminazione di acido libero. Sciogliere il residuo finale in acqua e portare ad 1.000 mL.

Soluzione di idrato di sodio (50 g L^{-1}). Sciogliere 50 g di idrato di sodio [NaOH] in acqua e diluire a 1.000 mL.

2.5. Procedimento

Porre il campione in una capsula di porcellana e diluire con acqua, se si è accertata l'assenza delle specie di cui a Tabella 1; se queste sono presenti aggiungere le soluzioni degli additivi. Aggiungere quindi 1 mL di una delle soluzioni tampone (in genere è sufficiente per ottenere un pH di 10) e 1÷2 gocce di nero eriocromo T. Titolare lentamente con EDTA agitando continuamente e facendo aggiunte ad intervalli di 3÷5 secondi, finche il colore passa da rosso al blu.

Condurre la titolazione a temperatura ambiente perché in acqua calda si ha la decomposizione dell'indicatore. Eseguire la titolazione immediatamente dopo l'aggiunta dell'indicatore poiché questo è instabile in ambiente alcalino.

È importante che la soluzione sia mantenuta a pH 10; se il campione ha un pH maggiore può aversi la precipitazione di carbonato di calcio e di idrossido di magnesio. Tali precipitati passano lentamente in soluzione per aggiunta del reattivo titolante, ma i risultati sono errati. Se il campione è diluito e se la titolazione è eseguita rapidamente (non più di 5 minuti) gli effetti della precipitazione vengono minimizzati.

La presenza di CO_2 può essere eliminata dal campione per acidificazione e successivo riscaldamento prima dell'aggiunta del tampone.

Poiché lo ione Mg^{++} deve essere presente per avere un viraggio netto, si aggiunge al tampone una piccola quantità di sale di magnesio dell'EDTA.

Ripetere il procedimento di cui ai punti precedenti usando 50 mL di soluzione standard di $CaCl_2$ e determinare il titolo esatto della soluzione di EDTA.

2.6. Espressione dei risultati

La somma degli ioni Ca^{++} e Mg^{++} in mg L^{-1}, si ottiene dalla relazione:

$$Ca^{++} + Mg^{++} (mg\ L^{-1}) = \frac{a \cdot T \cdot 1.000}{C} \cdot 100$$

dove:

a = volume (mL) di soluzione titolante;
T = titolo della soluzione di EDTA (mmol L^{-1});
C = volume (mL) di campione prelevato.

2.7. Precisione ed accuratezza

La precisione del metodo per la determinazione della durezza totale varia al variare della composizione delle acque. Generalmente i risultati ottenuti sono affetti da un errore di circa l'1 %.

3. Durezza calcica

3.1. Principio del metodo

La durezza calcica si determina mediante complessazione con l'acido etilendiamino tetraacetico (EDTA), operando su un campione di acqua tamponato a pH 10 in presenza di muresside, usata come indicatore.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, in particolare a quelle adibite ad uso potabile ed industriale.

3.2. Interferenze e cause di errore

La determinazione chelometrica non può essere impiegata per acque fortemente colorate in quanto il viraggio dell'indicatore in tali condizioni può risultare mascherato.
Anche sospensioni o sostanze organiche colloidali possono interferire, in quanto alterano il viraggio dell'indicatore. In questo caso il campione è portato a secchezza su bagno ad acqua e calcinato in muffola a 600 °C fino a completa distruzione della sostanza organica. Il residuo è ripreso con 20 mL di HCl 1 N, neutralizzato a pH 7 con NaOH 1 N e portato a 50 mL con acqua distillata. Raffreddato a temperatura ambiente, viene titolato.
Molti ioni metallici interferiscono nella determinazione, sia perché vengono anch'essi titolati dall'EDTA, sia perché possono mascherare il punto finale. Tali interferenze possono essere eliminate per aggiunta, prima della titolazione con EDTA, di additivi che hanno lo scopo di precipitare o di complessare i vari ioni interferenti. Nella Tabella 1 sono riportate le concentrazioni massime (in mg L^{-1}) delle sostanze interferenti che possono essere presenti nel campione originale, usando i vari additivi indicati, senza inficiare il risultato dell'analisi stessa.

3.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Buretta da 25 mL al decimo di mL.
- Capsula di porcellana da 250 mL.

3.4. Reattivi

Etilendiammino tetraacetato di sodio (EDTA). Sciogliere 4 g del sale biidrato in 800 mL di acqua. Determinare il titolo della soluzione così ottenuta con una di cloruro di calcio [$CaCl_2$] a titolo noto; aggiustare il volume della soluzione in modo che 1 mL corrisponda a 0,4 mg di Ca^{++}. Conservare la soluzione in bottiglia di politene e determinarne il titolo esatto periodicamente.
Soluzione di cloruro di calcio [$CaCl_2$]. Sciogliere 1.000 g di carbonato di calcio [$CaCO_3$] in HCl (1:4) aggiunto molto lentamente. Quando tutto il sale si è sciolto, evaporare fino a secchezza. Ripetere il trattamento fino alla totale eliminazione di acido libero. Sciogliere il residuo finale in acqua e portare ad 1.000 mL.
Soluzione di NaOH 50 g L^{-1}. Sciogliere 50 g di NaOH in acqua e diluire a 1.000 mL.
Indicatore- Muresside. Mescolare 0,2 g di purpurato di ammonio a 100 g di NaCl macinandoli fino ad una misura di 40÷50 mesh.

3.5. Procedimento

Porre il campione in una capsula di porcellana. Aggiungere 2 mL della soluzione di NaOH (50 g L^{-1}) ed agitare. Aggiungere circa 0,2 g dell'indicatore-muresside ed agitare. Aggiungere quindi la soluzione titolante, agitando continuamente fino a viraggio da rosa a porpora.
La titolazione deve essere eseguita immediatamente dopo l'aggiunta dell'indicatore poiché questo è instabile in ambiente alcalino.

3.6. Espressione dei risultati

Il contenuto in ioni Ca^{++} in mg L^{-1}, si ottiene dalla relazione:

$$Ca^{++} (mg\ L^{-1}) = \frac{a \cdot T \cdot 1.000}{C} \cdot 100$$

dove:

a = volume (mL) di soluzione titolante;
T = titolo della soluzione di EDTA (mmol L^{-1});
C = volume (mL) di campione prelevato.

3.7. Precisione ed accuratezza

La precisione del metodo per la determinazione della durezza totale varia al variare della composizione delle acque. Generalmente i risultati ottenuti sono affetti da un errore di circa l'1 %.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).
CNR - IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*. Quaderno 100 (Roma).

INDICI DELLA SALINITÀ

1. Generale

L'attitudine di un'acqua per l'irrigazione è funzione di parametri diversi, alcuni dei quali fra loro correlati. Per esprimere un giudizio di qualità non ci si può limitare a considerare solo una od alcune delle determinazioni proposte, ma è necessario un esame completo e comparativo di tutti gli indici più significativi indicati in letteratura.

2. Salinità

La salinità di un'acqua irrigua, se eccessiva, provoca fenomeni di accumulo salino nel terreno ed aumenti della pressione osmotica della soluzione circolante, che si ripercuotono negativamente sulle colture.
Sulla base della conducibilità elettrica (ECw), la salinità stessa può essere valutata come riportato nella Tabella 1.

Tabella 1 – Valutazione della qualità dell'acqua per l'irrigazione in funzione della salinità

ECw dS m^{-1}	Salinità	Valutazione
< 0,25	Bassa	idonea per l'irrigazione di tutti i terreni e per tutte le colture; occorre un certo drenaggio solo in terreni di permeabilità assolutamente bassa.
0,25÷0,75	Media	idonea solo se si realizza un moderato drenaggio; le piante moderatamente tolleranti la salinità possono crescere senza speciali pratiche di controllo della salinità.
0,75÷2,25	Alta	non può essere usata in terreni con limitazione di drenaggio; anche con un drenaggio medio possono essere richieste speciali pratiche per il controllo della salinità e comunque le piante coltivate debbono presentare una buona tolleranza alla salinità.
> 2,25	Molto alta	non idonea in linea generale all'irrigazione; può tuttavia essere usata occasionalmente ed in particolari situazioni e per terreni molto permeabili; il drenaggio deve essere efficiente e in quantità di acqua elevata per assicurare una notevole lisciviazione dei sali; possono essere coltivate solo piante molto tolleranti la salinità.

3. SAR (Rapporto di assorbimento dei sodio)

L'idoneità di un'acqua per uso irriguo, oltre che dalla quantità dei sali, è determinata anche dalla qualità degli stessi e soprattutto dal rapporto fra i cationi in soluzione (Na^+, Ca^{++}, Mg^{++}).
Per esprimere l'attività del sodio contenuto in un'acqua, e la sua possibilità a partecipare al fenomeno di scambio con il terreno, in antagonismo con il calcio ed il magnesio, si utilizza il rapporto di assorbimento del sodio, indicato con la sigla SAR (Sodium Adsorption Ratio) e dato dalla seguente formula:

$$SAR = \frac{Na^+}{\sqrt{\frac{Ca^{++} + Mg^{++}}{2}}}$$

nella quale le concentrazioni ioniche sono espresse in meq L^{-1}.
Il rapporto SAR mette in relazione l'attività dello ione sodio, negativo per il terreno, con l'attività degli ioni calcio e magnesio, positiva per il terreno. Più alto è il valore del rapporto, meno idonea è l'acqua per l'irrigazione.
La valutazione dell'acqua in base ai valori di SAR, è riportata nella Tabella 2.

Tabella 2 – Valutazione della qualità dell'acqua per l'irrigazione in funzione dell'SAR

SAR	Definizione	Valutazione
< 10	Bassa	idonea per l'irrigazione di tutti i terreni con minimo danno dovuto alla formazione di livelli nocivi di sodio di scambio.
10÷18	Media	presenta un apprezzabile pericolo di sodicizzazione in terreni di fine tessitura e con alta capacità di scambio, specialmente in condizioni di scarso drenaggio e se il gesso non è presente; acqua da usare in terreni di tessitura grossolana o sensibilmente organici con buona permeabilità.
18÷26	Alta	può produrre livelli nocivi di sodio scambiabile nella maggior parte dei terreni ed il suo uso richiede speciali trattamenti che inducano un ottimo drenaggio ed elevata lisciviazione, oltre a somministrazioni di sostanza organica umificata; i terreni gessiferi non sviluppano in genere livelli nocivi di sodio scambiabile se irrigati con tale acqua; possono essere richiesti ammendanti chimici per la sostituzione del sodio di scambio, eccetto che non si tratti già di acqua di elevata salinità.
> 26	Molto alta	generalmente non idonea per fini irrigui, eccettuato il caso di acqua di bassa e anche media salinità, nel quale la dissoluzione di calcio del terreno o l'uso di gesso (o altri ammendanti) può rendere possibile l'uso di tali acque.

4. Carbonato di sodio residuo (RSC)

Le acque che contengono elevate concentrazioni di ioni bicarbonato (HCO_3^-) presentano la tendenza, a seguito di possibile perdita di CO_2 o eventuale concentrazione della soluzione circolante dei terreno, a far precipitare calcio e magnesio sotto forma di carbonati.
La precipitazione parziale o totale di questi due elementi altera evidentemente il valore dei rapporto SAR nel senso che lo fa aumentare. Se gli anioni carbonato e bicarbonato prevalgono sui cationi calcio e magnesio, si può formare del carbonato di sodio che fa aumentare anche il grado di reazione in pH.
Eaton ha definito carbonato di sodio residuo la seguente differenza:

$$RSC = Na_2CO_3 \text{ residuo} = (CO_3^{=} + HCO_3^-) - (Ca^{++} + Mg^{++})$$

Se la differenza è negativa a seguito della precipitazione dei carbonati non vi è possibilità che si formi carbonato di sodio, se invece la differenza è positiva, tale possibilità esiste e l'utilizzazione dell'acqua è condizionata dalla quantità di carbonato di sodio residuo che si forma.

Sono considerate utilizzabili le acque il cui valore dei carbonato di sodio residuo è inferiore a 1,25 meq L^{-1}, parzialmente utilizzabili quelle con un contenuto compreso tra 1,25 e 2,50, non idonee quelle con un valore maggiore di 2,50.

5. SAR aggiustato (adjSAR) e nuovo SAR aggiustato (NadjSAR)

Il SAR, se per un verso consente di valutare l'effetto della sodicizzazione stessa sulla permeabilità e sul drenaggio, non tiene conto delle variazioni di concentrazione che possono aver luogo nella fase liquida a carico della precipitazione del calcio stesso e che possono verificarsi in seguito a fenomeni di precipitazione o di dissoluzione conseguenti all'intervento irriguo. Mentre infatti il sodio presente in fase liquida rimane comunque solubile ed in equilibrio con il sodio di scambio, il calcio subisce variazioni indotte o dal passaggio in fase liquida di minerali presenti nel terreno o dalla sua precipitazione, soprattutto sotto forma di carbonato. I fenomeni di dissoluzione sono chiaramente favoriti dalla diluizione e dalla presenza di CO_2; i fenomeni di precipitazione si verificano invece tutte le volte in cui la presenza di ioni Ca^{++} da una parte e ioni $CO_3^{=}$, HCO_3^{-} e $SO_4^{=}$ dall'altra è sufficiente a superare il valore del prodotto di solubilità del carbonato di calcio o del solfato di calcio. La dissoluzione o la precipitazione possono aver luogo quindi subito dopo l'intervento irriguo, con il conseguente instaurarsi di un equilibrio che non è più funzione della concentrazione dei calcio presente nell'acqua di irrigazione, ma piuttosto della concentrazione della fase liquida dei terreno.

Poiché il SAR non tiene conto di tali possibili eventi, esso è stato considerato come parametro non del tutto idoneo ai fini della valutazione della qualità delle acque di irrigazione. Per sopperire a tali carenze è stata proposta, in passato, l'adozione dei cosiddetto SAR aggiustato (adjSAR).

Il valore dei rapporto di assorbimento dei sodio aggiustato, può essere calcolato per mezzo della seguente formula:

$$\text{adjSAR} = \frac{Na^{+}}{\sqrt{\frac{Ca^{++} + Mg^{++}}{2}}} \times [1 + (8.4 - \text{pHc})]$$

In tale espressione il pHc rappresenta il pH teorico calcolato dell'acqua irrigua in contatto con il carbonato di calcio ed in equilibrio con la CO_2 del terreno.

Il valore di pHc può essere valutato sulla base dei risultati dell'analisi chimica, utilizzando la seguente formula:

$$\text{pHc} = (pK'_2 - pK'c) + p(Ca^{++} + Mg^{++}) + p(Alk)$$

nella quale:

$pK'_2 - pK'c$	=	$Ca^{++} + Mg^{++} + Na^{+}$	meq L^{-1}
$p(Ca^{++} + Mg^{++})$	=	$Ca^{++} + Mg^{++}$	meq L^{-1}
$p(Alk)$	=	$CO_3^{=} + HCO_3^{-}$	meq L^{-1}

Nella tabella 3 sono riportati i valori di $pK'_2-pK'c$, $p(Ca^{++}+Mg^{++})$, $p(Alk)$ corrispondenti ai differenti valori delle somme in meq L^{-1} dei rispettivi cationi ed anioni.

I valori di pHc superiori a 8,4 indicano una tendenza dell'acqua a sciogliere il calcare dal suolo; viceversa valori inferiori a 8,4 indicano una tendenza dell'acqua a lasciare precipitare il calcare nel suolo con il quale viene a contatto.

Comunque la letteratura più recente e qualificata ritiene che anche l'adjSAR vada abbandonato, in quanto esso porterebbe a sopravvalutare i rischi da sodio in eccesso, ed a scoraggiare l'impiego di acque ancora utilizzabili.

Tabella 3. Abaco per il calcolo del pHc

Somme dei meq L^{-1}	$pK'_2 - pK'c$	$p(Ca^{++} + Mg^{++})$	p(Alk)
0,05	2,0	4,6	4,3
0,10	2,0	4,3	4,0
0,15	2,0	4,1	3,8
0,20	2,0	4,0	3,7
0,25	2,0	3,9	3,6
0,30	2,0	3,8	3,5
0,40	2,0	3,7	3,4
0,50	2,1	3,6	3,3
0,75	2,1	3,4	3,1
1,00	2,1	3,3	3,0
1,25	2,1	3,2	2,9
1,50	2,1	3,1	2,8
2,00	2,2	3,0	2,7
2,50	2,2	2,9	2,6
3,00	2,2	2,8	2,5
4,00	2,2	2,7	2,4
5,00	2,2	2,6	2,3
6,00	2,2	2,5	2,2
8,00	2,3	2,4	2,1
10,0	2,3	2,3	2,0
12,5	2,3	2,2	1,9
15,0	2,3	2,1	1,8
20,0	2,3	2,0	1,7
30,0	2,4	1,8	1,5
50,0	2,5	1,6	1,3
80,0	2,5	1,4	1,1

Sulla base di indagini condotte da Suarez e Rhoades nei primi anni '80 è stata proposta un'ulteriore correzione della equazione dei SAR, che valuta la concentrazione delle specie ioniche dopo l'intervento irriguo e tiene conto dell'effetto della CO_2, dei HCO_3^- e della ECw sul calcio che, prima presente nell'acqua utilizzata, entra successivamente a far parte dei sistema acqua-terreno. Il procedimento attraverso il quale la correzione viene operata è fondato sul presupposto che nel terreno vi sia una fonte di calcio, costituita dal calcare o dai silicati, e che non abbiano luogo fenomeni di precipitazione a carico dei magnesio.
Il nuovo parametro viene indicato con la sigla NadjSAR e prende il nome di "nuovo SAR aggiustato". Esso è utilizzato per meglio controllare eventuali problemi di permeabilità nel terreno. L'equazione per il calcolo è la seguente:

$$NadjSAR = \frac{Na^+}{\sqrt{\frac{Ca_X + Mg^{++}}{2}}}$$

dove Na^+ e Mg^{++} sono espressi in meq L^{-1}; Ca_X è la concentrazione del Ca^{++} modificata in relazione alla conducibilità elettrica dell'acqua (ECw), al rapporto $[HCO_3^-]/[Ca^{++}]$ dove HCO_3^- e Ca^{++} sono espressi in meq L^{-1} ed alla pressione parziale della CO_2 nei primi millimetri superficiali del terreno stimata pari a 0,07 kPa.

Il valore di Ca_X può essere ricavato dalla Tabella 4.

6. Limite di Todd

Il fenomeno dell'influenza del mare sulle falde acquifere, che si manifesta attraverso il miscelamento dell'acqua di mare con quella di falda, assume notevole importanza in alcune zone costiere dei nostro paese.

La contaminazione dell'acqua di falda mediante l'acqua marina, essendo la prima ricca di ioni HCO_3^- e la seconda in ioni Cl^-, viene valutata calcolando il rapporto $Cl^-/(HCO_3^- + CO_3^{=})$. Il valore 0,5 di questo rapporto segna il limite di demarcazione fra le acque di falda non contaminate e quelle contaminate dall'acqua di mare.

Il grado di contaminazione può essere valutato secondo la Tabella 5.

Tabella 4 - Abaco per il calcolo del valore di Ca_x

Rapporto	**ECw dell'acqua irrigua dS m^{-1}**											
HCO_3^-/Ca^{++}	**0,1**	**0,2**	**0,3**	**0,5**	**0,7**	**1,0**	**1,5**	**2,0**	**3,0**	**4,0**	**6,0**	**8,0**
0,05	13,20	13,61	13,92	14,40	14,79	15,26	15,91	16,43	17,29	17,97	19,07	19,94
0,10	8,31	8,57	8,77	9,07	9,31	9,62	10,00	10,35	10,89	11,32	12,01	12,58
0,20	5,24	5,40	5,52	5,71	5,87	6,05	6,31	6,52	6,96	7,13	7,57	7,91
0,25	4,51	4,65	4,76	4,92	5,06	5,22	5,44	5,62	5,91	6,15	6,52	6,82
0,30	4,00	4,12	4,21	4,36	4,48	4,62	4,82	4,98	5,24	5,44	5,77	6,04
0,35	3,61	3,72	3,80	3,94	4,04	4,17	4,35	4,49	4,72	4,91	5,21	5,45
0,40	3,30	3,40	3,48	3,60	3,70	3,82	3,98	4,11	4,32	4,49	4,77	4,98
0,45	3,05	3,14	3,22	3,33	3,42	3,53	3,68	3,80	4,00	4,15	4,41	4,61
0,50	2,84	2,93	3,00	3,10	3,19	3,29	3,43	3,54	3,72	3,87	4,11	4,30
0,75	2,17	2,24	2,29	2,37	2,43	2,51	2,62	2,70	2,84	2,95	3,14	3,28
1,00	1,79	1,85	1,89	1,96	2,01	2,09	2,16	2,23	2,35	2,44	2,59	2,71
1,25	1,54	1,59	1,63	1,68	1,73	1,78	1,86	1,92	2,02	2,10	2,23	2,33
1,50	1,37	1,41	1,44	1,49	1,53	1,58	1,65	1,70	1,79	1,86	1,97	2,07
1,75	1,23	1,27	1,30	1,35	1,38	1,43	1,49	1,54	1,62	1,68	1,78	1,86
2,00	1,13	1,16	1,19	1,23	1,26	1,31	1,36	1,40	1,48	1,54	1,63	1,70
2,25	1,04	1,08	1,10	1,14	1,17	1,21	1,26	1,30	1,37	1,42	1,51	1,58
2,50	0,97	1,00	1,02	1,05	1,09	1,12	1,17	1,21	1,27	1,32	1,40	1,47
3,00	0,85	0,89	0,91	0,94	0,96	1,00	1,04	1,07	1,13	1,17	1,24	1,30
3,50	0,78	0,80	0,82	0,85	0,87	0,90	0,94	0,97	1,02	1,06	1,12	1,17
4,00	0,71	0,73	0,75	0,78	0,80	0,82	0,85	0,88	0,93	0,97	1,03	1,07
4,50	0,66	0,68	0,69	0,72	0,74	0,76	0,79	0,82	0,86	0,90	0,95	0,99
5,00	0,61	0,63	0,65	0,67	0,69	0,71	0,74	0,76	0,80	0,83	0,88	0,93
7,00	0,49	0,50	0,52	0,53	0,55	0,57	0,59	0,61	0,64	0,67	0,71	0,74
10,00	0,39	0,40	0,41	0,42	0,43	0,45	0,47	0,48	0,51	0,53	0,56	0,58
20,00	0,24	0,25	0,26	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,35	0,37
30,00	0,18	0,19	0,20	0,20	0,21	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,27	0,28

Tabella 5. Classificazione delle acque di falda secondo Todd

Classe	$Cl^-/(HCO_3^- + CO_3^=)$	Tipo di acqua
1	< 0,50	Acqua di falda non contaminata dal mare
2	0,50÷1,30	Acqua di falda lievissimamente contaminata dal mare
3	1,30÷2,80	Acqua di falda lievemente contaminata dal mare
4	2,80÷6,60	Acqua di falda moderatamente contaminata dal mare
5	6,60÷15,60	Acqua di falda sensibilmente contaminata dal mare
6	> 15,60	Acqua di falda fortemente contaminata dal mare

Bibliografia

FAO (1976), *Water quality for Agricufture*. Irrigation and Drainage Paper n. 29.
FAO-UNESCO (1973), *Irrigation, drainage and salinty*. Hutchinson and Co.
EATON F.M. (1950), *Significance of carbonates in irrigation water*. Soil Science, 69,123.
RICHARDS L.A. (1954), *Diagnosis and improvement of saline and alkali soils*. Agriculture Handbook n. 60. U.S.D.A. Washington D.C.
ROMANO E., MECELLA G. (1982), *Guida pratica per il rilevamento delle caratteristiche pedoagronomiche dei terreni* - Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Roma.
SUAREZ D.L. (1981), *Relationship between pHc and SAR and an alternative method of estimating SAR of soil or drainage water*. Soil Sci. Soc. Am. J., 45.
THORNE D. W., PETERSON H.B. (1954), *Irrigated soils*. The Blakiston Company, Inc., Toronto.
TODD D.K. (1959), *Groundwater Hydrology*. Shon Wiley e Sons Inc., London.

OSSIGENO DISCIOLTO

1. Determinazione amperometrica

1.1. Principio del metodo

L'ossigeno disciolto in soluzione passa attraverso una membrana e si riduce al catodo polarizzato di una cella elettrolitica o di una cella galvanica. La sottile membrana, dello spessore di circa 0,1 mm, costituita da un polimero organico, protegge il sistema elettrodico da altre specie riducibili presenti in acqua e permette il passaggio solo di una frazione delle molecole di ossigeno. Il segnale di corrente, che è controllato dalla diffusione dell'ossigeno attraverso la membrana, viene amplificato e l'intensità della corrente risultante è proporzionale all'attività dell'ossigeno in soluzione. Il sistema elettrodico è formato da un catodo, un anodo e da un elettrolita. Il catodo può essere polarizzato da una batteria esterna, e si ha in questo caso una cella elettrolitica; se la polarizzazione avviene all'anodo si ha una cella galvanica. Il materiale catodico è un metallo relativamente nobile, come oro ed argento. L'anodo varia a seconda che la cella di misura sia di tipo elettrolitico o galvanico: nelle celle elettrolitiche si utilizzano elettrodi di riferimento del tipo Ag/Ag_2O, $Ag/AgCl$, Hg/Hg_2Cl_2; in quelle galvaniche, il materiale anodico è costituito da un metallo che non ha tendenza a passivarsi e che si ossida con facilità (p.e. Zn, Pb, Cd). L'elettrolita è costituito da una soluzione che non attacca gli elettrodi in modo apprezzabile quando il circuito è aperto; si impiegano soluzioni di KOH, $KHCO_3$, KCl, NH_4Cl.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, di scarico e di mare per valori di ossigeno disciolto superiori a 0,5 mg L^{-1}.

1.2. Interferenze e cause di errore

Interferiscono nella misura solo quei gas che vengono ridotti nelle stesse condizioni sperimentali dell'ossigeno e precisamente l'anidride solforosa, il cloro, il bromo, lo iodio e gli ossidi di azoto; l'idrogeno solforato e i mercaptani avvelenano gli elettrodi.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Ossimetro con alimentazione a batteria e/o a rete.
- Sistema elettrodico di misura.
- Termometro a 1/10 di grado.
- Agitatore magnetico con barette di materiale inerte.

1.4. Reattivi

Acqua distillata satura di ossigeno. Per la saturazione è indifferente usare ossigeno o aria.
Soluzione elettrolitica (KCl 175 g L^{-1}). Sciogliere 17,5 g di cloruro di potassio [KCl] in acqua distillata e portare a 100 mL in matraccio tarato.

1.5. Procedimento

1.5.1. Standardizzazione

La determinazione viene eseguita con dispositivi e con apparecchiature commerciali e di conseguenza la successione delle operazioni può variare da strumento a strumento. In genere, per poter eseguire una determinazione di ossigeno in soluzione, si deve provvedere alla calibrazione del sistema elettrodico che deve essere introdotto in una soluzione a contenuto noto di ossigeno. La solubilità dell'ossigeno in acqua pura saturata con aria a varie pressioni atmosferiche è disponibile in opportune tabelle.

1.5.2. Calibrazione

Per la calibrazione è indifferente usare l'aria o una soluzione satura di questa, poiché l'attività dell'ossigeno, in entrambi i casi, è la medesima, e la quantità di ossigeno che diffonde attraverso la membrana e che si riduce al catodo è quindi la stessa. Per mezzo del controllo di calibrazione esistente in tutti gli strumenti, riportare l'ago dello strumento al valore di concentrazione di ossigeno della soluzione prescelta.

1.5.3. Dosaggio

Introdurre il dispositivo elettrodico nell'acqua in esame e leggere il valore della concentrazione di ossigeno sulla scala dell'apparecchio avendo cura di evitare che il campione resti esposto all'aria per più di 30 secondi. I dispositivi impiegati per la determinazione amperometrica dell'ossigeno hanno una precisione pari a ±0,1 mg L^{-1}; essi forniscono un responso rapido e diretto.

L'invecchiamento e la variazione di elasticità della membrana rendono necessaria una frequente calibrazione del dispositivo elettrodico ed il rinnovo periodico della membrana stessa. Si deve tener conto anche del fatto che, essendo la determinazione dell'ossigeno basata sulla velocità di diffusione di questo gas il cui coefficiente di diffusione varia con la temperatura (circa 2,5÷5% °C), è necessario eseguire la misura alla stessa temperatura della calibrazione ovvero compensare la variazione di questa. Il segnale di corrente dipende inoltre dall'efficienza dell'agitazione del campione in esame.

1.6. Espressione dei risultati

La strumentazione disponibile in commercio per la determinazione dell'ossigeno disciolto è, di norma direttamente tarata in mg L^{-1} di ossigeno.

La concentrazione dell'ossigeno disciolto può essere espressa in mg L^{-1}, in mL L^{-1} di Ossigeno a 0 °C e 100 kPa, o anche in percentuale di saturazione.

Per trasformare i mg L^{-1} in mL L^{-1} a 0°C e 100 kPa si moltiplica il valore in mg L^{-1} per 0,7.

La percentuale di saturazione corrisponde al rapporto percentuale tra la concentrazione dell'ossigeno disciolto determinata e la corrispondente concentrazione di saturazione alla temperatura registrata al momento del prelievo, ambedue espresse in mg L^{-1} di Ossigeno.

La concentrazione di saturazione può essere ricavata dalla Tabella 1 nella quale la solubilità dell'ossigeno è riportata in funzione della temperatura e della concentrazione in cloruri della soluzione, alla pressione di 100 kPa o 760 mm/Hg.

Per pressioni diverse da detto valore, la concentrazione di saturazione si ricava dalla seguente formula di correzione:

$$S_p = S_{760} \cdot \frac{P-p}{760-p}$$

dove:

S_p = concentrazione di saturazione (mg L^{-1} O_2) alla pressione P;
S_{760} = concentrazione di saturazione (mg L^{-1} O_2) a 760 mm Hg, ricavata alla Tabella 1;
P = pressione ambiente in mm Hg;
p = tensione di vapore dell'acqua alla temperatura del campione in mm Hg.

Per altitudini inferiori a 1.000 m s.l.m. e temperature inferiori a 25 °C, il termine relativo alla tensione di vapore dell'acqua può essere trascurato.

1.7. Precisione ed accuratezza

La precisione e l'accuratezza del metodo non possono essere stabilite poiché variano secondo i composti interferenti e secondo la loro concentrazione.

Tabella 1 – Solubilità dell'ossigeno in acqua esposta ad aria satura di vapor d'acqua

Temperatura (°C)	Concentrazione in Cl^- (mg L^{-1})					Differenza per 100 mg L^{-1} di Cl^-
	0	5	10	15	20	
	Ossigeno disciolto					
0	14,6	13,8	13,0	12,1	11,3	0,017
1	14,2	13,4	12,6	11,8	11,0	0,016
2	13,8	13,1	12,3	11,5	10,8	0,015
3	13,5	12,7	12,0	11,2	10,5	0,015
4	13,1	12,4	11,7	11,0	10,3	0,014
5	12,8	12,1	11,4	10,7	10,0	0,014
6	12,5	11,8	11,1	10,5	9,8	0,014
7	12,2	11,5	10,9	10,2	9,6	0,013
8	11,9	11,2	10,6	10,0	9,4	0,013
9	11,6	11,0	10,4	9,8	9,2	0,012
10	11,3	10,7	10,1	9,6	9,0	0,012
11	11,1	10,5	9,9	9,4	8,8	0,011
12	10,8	10,3	9,7	9,2	8,6	0,011
13	10,6	10,1	9,5	9,0	8,5	0,011
14	10,4	9,9	9,3	8,8	8,3	0,010
15	10,2	9,7	9,1	8,6	8,1	0,010
16	10,0	9,5	9,0	8,5	8,0	0,010
17	9,7	9,3	8,8	8,3	7,8	0,010
18	9,5	9,1	8,6	8,2	7,7	0,009
19	9,4	8,9	8,5	8,0	7,6	0,009
20	9,2	8,7	8,3	7,9	7,4	0,009
21	9,0	8,6	8,1	7,7	7,3	0,009
22	8,8	8,4	8,0	7,6	7,1	0,008
23	8,7	8,3	7,9	7,4	7,0	0,008
24	8,5	8,1	7,7	7,3	6,9	0,008
25	8,4	8,0	7,6	7,2	6,7	0,008
26	8,2	7,8	7,4	7,0	6,6	0,008
27	8,1	7,7	7,3	6,9	6,5	0,008
28	7,9	7,5	7,1	6,8	6,4	0,008
29	7,8	7,4	7,0	6,6	6,3	0,008
30	7,6	7,3	6,9	6,5	6,1	0,008

2. Determinazione iodometrica

2.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'ossidazione dell'idrossido di manganese(II) a stati di valenza superiore in soluzione alcalina da parte dell'ossigeno disciolto; per successiva acidificazione in presenza di ioduro, il manganese ossidato si riduce a Mn(II), liberando iodio in quantità equivalente all'ossigeno inizialmente presente nel campione. Lo iodio messo in libertà viene titolato con una soluzione a concentrazione nota di tiosolfato sodico, in presenza di salda d'amido.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, di scarico e di mare per valori di ossigeno disciolto superiori a 0,5 mg L^{-1}.

2.2. Interferenze e cause di errore

Questo metodo è di impiego generale, e può essere utilizzato in presenza di nitriti, che molto comunemente si trovano nelle acque.

Il metodo può essere utilizzato anche in presenza di 100÷200 mg L^{-1} di ferro(III) se prima dell'acidificazione del campione si aggiunge una soluzione di fluoruro di potassio e si esegue subito la titolazione.

Il metodo non può essere applicato se sono presenti altre sostanze riducenti od ossidanti.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Bottiglie di vetro da circa 300 mL con tappo a smeriglio o meglio a becco di flauto.
- Pipette da 10 mL graduate a 0,1 mL e da 1 mL.
- Burette da 50 mL graduate a 0,1 mL.
- Termometro a 1/10 di grado.

2.4. Reattivi

Soluzione alcalina di ioduro-sodio azide (150 g L^{-1} di KI). Sciogliere 500 g di NaOH (o 700 di KOH) e 135 g di NaI (o 150 g di KI) in acqua distillata e diluire a circa 900 mL. Si possono usare indifferentemente i composti del sodio o del potassio. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide, NaN_3, sciolti in 40 mL di acqua distillata, e portare a 1.000 mL con acqua. Diluendo 1 mL di reattivo a 50 mL e acidificando, per aggiunta di salda d'amido non si deve osservare alcuna colorazione. Conservare in bottiglia scura con tappo di gomma.

Se si dispone di NaI (o KI) impuro per iodio, sciogliere 135 g di NaI (150 g di KI) in 500 mL di acqua, aggiungendo poche gocce di acido acetico. Aggiungere poi 1 g di polvere di zinco e agitare fino a che la soluzione diviene incolore. Filtrare, aggiungere subito dopo 400 g di NaOH, raffreddare e diluire ad 1.000 mL.

Soluzione di solfato manganoso. Sciogliere 364 g di solfato manganoso idrato [$MnSO_4 \cdot H_2O$] in acqua distillata; filtrare se necessario e diluire a 1.000 mL con acqua. Aggiungendo a questa soluzione una soluzione acida di KI si devono osservare solo tracce di iodio.

Soluzione di fluoruro di potassio. Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio biidrato [$KF \cdot 2H_2O$] in acqua distillata e diluire a 1.000 mL.

Soluzione standard di tiosolfato sodico (0,1 N). Sciogliere in un pallone tarato da 1.000 mL, 25 g di tiosolfato sodico [$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$] in circa 800 mL di acqua preventivamente bollita e raffreddata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico oppure 4 g di tetraborato sodico. Portare a 1.000 mL con acqua bollita. La standardizzazione viene eseguita con $K_2Cr_2O_7$ o con KIO_3 o $KH(IO_3)_2$ seccati a 110 °C.

Nel caso si usi il bicromato, sciogliere 0,0981 g di $K_4Cr_2O_7$ in circa 100 mL di acqua. Aggiungere circa 2 g di KI esente da iodio e quindi 7 mL di HCl concentrato; mescolare e titolare subito dopo con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore. Il titolo della soluzione di tiosolfato si ricava dall'espressione:

$$\text{Normalità } (Na_2S_2O_3) = \frac{P \cdot 1.000}{49{,}035 \cdot t}$$

dove:

P = quantità (g) di $K_4Cr_2O_7$ usata per la titolazione;
t = mL di soluzione di $Na_2S_2O_3$ utilizzati per la titolazione.

Nel caso si usi lo iodato o lo iodato acido, sciogliere 3,567 g di KIO_3 o 3,25 g di $KH(IO_3)_2$ in acqua e diluire ad 1.000 mL in pallone tarato; la soluzione risultante è 0,01 N. Prelevare 25÷30 mL di soluzione di tiosolfato e procedere come sopra descritto.

Soluzione standard di tiosolfato sodico (0,0125 N; 1 mL = 0,1 mg di O_2). Diluire 125 mL della soluzione 0,1 N a 1.000 mL con acqua.

Salda d'amido. Porre in un mortaio 5÷6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1.000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciare depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante.

La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

Acido solforico concentrato (H_2SO_4 d = 1,84). 1 mL di questo acido è equivalente a circa 3 mL del reattivo ioduro alcalino-sodio azide.

2.5. Procedimento

Aggiungere al campione contenuto nella bottiglia con tappo a smeriglio, 2 mL di soluzione di solfato di manganese e 2 mL di soluzione alcalina di ioduro-sodio azide, avendo cura di introdurre quest'ultima ben al di sotto della superficie del liquido.

Chiudere la bottiglia eliminando le bolle d'aria e agitare capovolgendo molte volte la bottiglia; ripetere l'agitazione una seconda volta dopo che il precipitato si è depositato lasciando il liquido sovrastante limpido.

Quando il precipitato si è nuovamente depositato lasciando almeno 100 mL di liquido limpido, aprire la bottiglia ed aggiungere 2 mL di acido solforico concentrato avendo cura di farlo fluire lungo il collo della bottiglia.

Se il campione contiene ferro(III) aggiungere, prima di acidificare, 1 mL di soluzione di KF.

Tappare nuovamente la bottiglia ed effettuare il mescolamento capovolgendo varie volte la bottiglia finché lo iodio non è uniformemente distribuito; decantare la soluzione e titolare subito 100 mL con la soluzione di tiosolfato sodico 0,0125 N, fino a un colore giallo paglierino.

Aggiungere la salda d'amido e continuare a titolare fino a scomparsa del colore azzurro.

2.6. Espressione dei risultati

$$\text{Ossigeno disciolto (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{a \cdot N \cdot f \cdot 8}{100} \cdot 1.000$$

dove:

- a = volume (mL) di soluzione di tiosolfato consumato per la titolazione;
- N = normalità della soluzione di tiosolfato;
- f = B/(B-4): è un fattore di correzione che tiene conto del volume di campione spostato per l'introduzione dei reattivi (B è il volume della bottiglia in mL).

La concentrazione dell'ossigeno disciolto può essere espressa in mg L^{-1}, in mL L^{-1} di Ossigeno 0°C e 100 kPa (760 Torr), o anche in percentuale di saturazione.

Per trasformare i mg L^{-1} in mL L^{-1} a 0°C e 760 Torr si moltiplica il valore in mg L^{-1} per 0,7.

La percentuale di saturazione corrisponde al rapporto percentuale tra la concentrazione dell'ossigeno disciolto determinata e la corrispondente concentrazione di saturazione alla temperatura registrata al momento del prelievo, ambedue espresse in mg L^{-1} di O_2.

La concentrazione di saturazione può essere ricavata dalla Tabella 1 nella quale la solubilità dell'ossigeno è riportata in funzione della temperatura e della concentrazione in cloruri della soluzione, alla pressione di 760 mm Hg (Torr).

Per pressioni diverse da detto valore, la concentrazione di saturazione si ricava dalla seguente formula di correzione:

$$S_p = S_{760} \cdot \frac{P-p}{760-p}$$

dove:

- S_p = concentrazione di saturazione (mg L^{-1} O_2) alla pressione P;
- S_{760} = concentrazione di saturazione (mg L^{-1} O_2) a 760 mm Hg, ricavata alla Tabella 1;
- P = pressione ambiente in mm Hg;
- p = tensione di vapore dell'acqua alla temperatura del campione in mm Hg.

Per altitudini inferiori a 1.000 m s.l.m. e temperature inferiori a 25 °C, il termine relativo alla tensione di vapore dell'acqua può essere trascurato.

2.7. Precisione ed accuratezza

La precisione e l'accuratezza del metodo non possono essere stabilite poiché variano secondo i composti interferenti e secondo la loro concentrazione.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

REAZIONE

1. Determinazione potenziometrica

1.1. Principio del metodo

La reazione (pH) di un'acqua viene determinata per via potenziometrica utilizzando, come sensore, un elettrodo a vetro combinato con opportuno elettrodo di riferimento. Il valore da determinare viene ottenuto dopo aver effettuato un'operazione di taratura con due soluzioni tampone a pH noto portate alla stessa temperatura del campione. Nel caso in cui vengano impiegati strumenti muniti di dispositivi per la correzione del pH in funzione della temperatura è sufficiente conoscere i valori di temperatura e azionare opportunamente le manopole dello strumento.
Il metodo è applicabile a campioni di acque naturali, di scarico e di mare.

1.2. Interferenze e cause di errore

La risposta dell'elettrodo a vetro in misure non continue per campioni diversi non è in genere influenzata dalla presenza di sistemi redox, di sostanze colorate e dalla torbidità della soluzione. Condizionando correttamente l'elettrodo nei riguardi della temperatura e della composizione del campione la risposta strumentale è rapida e costante.
Possono essere causa di errore:

- la presenza nel campione di sostanze in sospensione, come oli, grassi e colloidi in quantità tali da ricoprire la superficie dell'elettrodo a vetro;
- la presenza di solidi sospesi o ioni in soluzione, che con il K^+ o il Cl^- del liquido di giunzione diano luogo alla formazione di sali insolubili, in quantità tali da impedire la formazione di una superficie di contatto riproducibile tra la soluzione in esame e l'elettrodo di riferimento. Tutti questi fenomeni sono evidenziati da larghe fluttuazioni del tutto occasionali del dato strumentale. In casi del genere può essere necessaria una cauta filtrazione.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- pH metro predisposto per misure con elettrodo a vetro.
- Elettrodo a vetro combinato con elettrodo di riferimento (generalmente a calomelano saturo + KCl 3,5 moli L^{-1} o saturo) e giunzione salina a KCl concentrato (3,5 moli L^{-1} o saturo). Usare elettrodi con risposta lineare nel campo di pH 1÷13. Poiché la membrana dell'elettrodo di vetro è soggetta ad invecchiamento è opportuno eseguire periodici controlli sulla funzionalità dell'elettrodo verificandone la riproducibilità della risposta per immersioni alternate in soluzioni tampone a differenti pH.
- Termometro a 0,5 di grado nel campo utile di temperatura.
- Agitatore magnetico con barrette di teflon o altro materiale inerte.
- Termostato stabile entro 1 °C.

1.4. Reattivi

Acqua deionizzata.

Tampone B: soluzione tampone di ftalato (pH 4 a 15 °C e 20 °C; 4,01 a 25 °C). Introdurre 10,12 g di idrogenoftalato di potassio [$C_8H_5KO_4$] (usare sale puro per tamponi seccato in stufa a temperature inferiore a 135 °C) in recipiente di vetro o polietilene munito di tappo, sciogliere e diluire a 1.000 mL con acqua;

Tampone C: soluzione tampone di borace (pH = 9,28 a 15 °C; 9,22 a 20 °C; 9,18 a 25 °C). Sciogliere 3,80 g di tetraborato di sodio decaidrato [$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$] (usare sale puro per tamponi) in recipiente di polietilene munito di tappo, sciogliere e diluire con 1.000 mL di acqua.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura dello strumento

Predisporre lo strumento per la misura secondo le istruzioni della Casa costruttrice. Pulire la membrana dell'elettrodo con carta da filtro per leggero strofinio. Controllare che il liquido di giunzione dell'elettrodo combinato sia al livello previsto e, se necessario, rimboccare con soluzione di riserva. Immergere l'elettrodo nella soluzione di misura dopo averlo brevemente lavato con acqua e con detta soluzione. Attendere qualche minuto sino al raggiungimento dell'equilibrio termico. Se si ricorre all'agitazione meccanica della soluzione, agitare per 30 secondi blandamente e misurare dopo un'attesa di altri 30 secondi circa. Se l'elettrodo è stato conservato a lungo non immerso nella soluzione salina di giunzione, occorre condizionarlo con acqua per almeno due ore.

Si misura il pH del tampone B e, una volta raggiunti valori riproducibili a 0,02 unità di pH, manovrare la manopola ("asimmetria" o "pH correction" o altro) in maniera da far coincidere il valore sperimentale con il valore teorico del tampone B. Lavare la cella e l'elettrodo con acqua, e poi con soluzione di tampone C. Procedere come detto anche per questo tampone, senza operare più alcuna modifica sulle manopole dello strumento. Riportare in diagramma in ascissa i valori di pH sperimentali dei due tamponi B e C ed in ordinata i valori teorici, interpolando linearmente tra i due punti. In genere, se l'elettrodo è correttamente conservato e non soggetto ad elevati sbalzi di temperatura, un diagramma di taratura può rimanere valido per mesi.

1.5.2. Misura

Si condiziona l'elettrodo e la cella di misura come riportato prima. A regime termico raggiunto, si misura la temperatura del campione e s'imposta sullo strumento il corrispondente valore nella correzione manuale di temperatura (nel caso di correzione automatica la sonda resistiva è stata introdotta nella cella sin dall'inizio).

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore del pH misurato si risale al valore corretto utilizzando il diagramma di taratura effettuato alla stessa temperatura (entro 2 °C).

Il grado di reazione viene espresso come unità di pH, con una cifra decimale.

1.7. Precisione ed accuratezza

Nel caso di campioni contenenti CO_2, SO_2 o altre sostanze gassose, che in soluzione partecipano ad equilibri acido-base, la precisione come l'accuratezza dipendono dal grado di non alterazione di questi equilibri per scambi con l'atmosfera. In genere, un'accuratezza ed una precisione a meno di 0,05 unità di pH può essere facilmente raggiunta.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

RICHIESTA BIOCHIMICA DI OSSIGENO (BOD)

1. Determinazione chimica

1.1. Principio del metodo

Il saggio del BOD (Biochemical Oxygen Demand) esprime la quantità di ossigeno necessaria per l'ossidazione biochimica delle sostanze contenute in un'acqua nelle condizioni in cui viene eseguito il saggio stesso. Detta determinazione tende a riprodurre in laboratorio le condizioni che si possono verificare normalmente nei corpi idrici e negli impianti di depurazione di tipo biologico.
La richiesta di ossigeno è dovuta generalmente a tre classi di sostanze:

Classe A - Composti organici, i cui atomi di carbonio vengono utilizzati dai microrganismi come alimento per le varie attività vitali (accrescimento, respirazione, riproduzione).

Classe B - Composti ossidabili dell'azoto utilizzati come fonte energetica da batteri specifici come ad esempio il Nitrosomonas e il Nitrobacter.

Classe C - Sostanze inorganiche, come ad esempio ferro(II), solfuri e solfiti, che vengono facilmente ossidate dall'ossigeno presente nelle acque.

Le sostanze appartenenti alle prime due classi A e B consumano ossigeno attraverso meccanismi biochimici, mentre quelle della classe C generalmente attraverso processi chimici.
La determinazione del BOD può essere effettuata con metodi chimici, fisici e elettrochimici.
I metodi chimici vengono adottati di preferenza in quanto possono essere eseguiti, in qualunque laboratorio, senza l'impiego di particolari apparecchiature.
Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare prima e dopo incubazione, al buio ed alla temperatura di 20°C, di cinque giorni. La differenza fra le due determinazioni dà il valore del BOD_5 del campione, espresso in mg L^{-1} di ossigeno.
Il metodo può essere applicato per acque naturali e di scarico aventi un BOD_5 inferiore a 5 mg L^{-1}, purché non siano presenti sostanze inibitrici, i valori di pH siano compresi tra 6,5 ed 8,3 e sia garantita un'adeguata flora batterica.

1.2. Interferenze e cause di errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto; l'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa. Ad esempio, nel caso di nitriti, ferro(II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro(III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno
1 mg di ossido di ferro(II) = 0,12 mg di ossigeno
1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno
1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno

Interferenze negative possono essere provocate dalla presenza di cloro libero o metalli tossici a causa della loro azione inibitrice. Analoga azione inibitrice è causata da valori di pH inferiori a 6,5 o superiori a 8,3.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Bottiglie di incubazione, della capacità di 300 mL (±1,5 mL), fornite di tappo a smeriglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia, nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate, deve essere determinato a 20 °C e annotato.
- Termostato, da usare a 20 °C, regolabile a ±1 °C.
- Compressore o bombola d'aria compressa. Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.
- Setto poroso per l'aerazione.

1.4. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reattivi puri per analisi.

Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide. Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio [NaOH], posti in una beuta da 1.000 mL munita di tappo di gomma, in 250 mL di acqua e raffreddare a temperatura ambiente. Addizionare 150 g di ioduro di potassio [KI] e diluire a circa 900 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio-azide [NaN_3], previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1.000 mL e portare a volume con acqua. Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

Soluzione di solfato di manganese(II) (364 g L^{-1}). Sciogliere 364 g di solfato di manganese(II) monoidrato [$MnSO_4 \cdot H_2O$] in acqua: filtrare, se necessario, e diluire a 1.000 mL.

Soluzione di fluoruro di potassio (400 g L^{-1}). Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidratato [$KF \cdot 2H_2O$] in acqua e diluire a 100 mL.

Soluzione di tiosolfato di sodio, 0,1 N. In un pallone tarato da 1.000 mL sciogliere 25 g di tiosolfato di sodio pentaidrato [$Na_2S_2O_4 \cdot 5H_2O$] in circa 800 mL di acqua precedentemente bollita e raffreddata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato di sodio [Na_2CO_3] oppure 4 g di tetraborato di sodio decaidrato [$Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$]. Portare a 1.000 mL sempre con acqua bollita e raffreddata. Il controllo del titolo della soluzione viene generalmente eseguito con bicromato di potassio [$K_2Cr_2O_7$]. Può essere anche usato lo iodato di potassio [KIO_3] o lo iodato di idrogeno e potassio [$KH(IO_3)_2$]. Detti reattivi debbono essere essiccati a 110 °C prima dell'uso per 2 ore circa. Nel caso si usi il bicromato, sciogliere 0,0981 g di sale di potassio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere circa 2 g di ioduro di potassio, esente da iodio, e quindi 7 mL di acido cloridrico [HCl] concentrato; mescolare e titolare subito dopo con la soluzione di tiosolfato, usando salda d'amido come indicatore. Il titolo della soluzione di tiosolfato si ricava dalla seguente espressione:

$$\text{Normalità } Na_2S_2O_3 = \frac{p \cdot 1000}{49{,}035 \cdot V}$$

dove:

p	=	peso in grammi di $K_2Cr_2O_7$;
V	=	mL di soluzione di tiosolfato di sodio utilizzati per la titolazione;
49,035	=	peso equivalente del bicromato di potassio.

Soluzione di tiosolfato di sodio, 0,0125 N (1 mL = 0,1 mg di O_2). Diluire 125 mL della soluzione tiosolfato di sodio 0,1 N a 1.000 mL con acqua. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

Salda d'amido. Stemperare in un mortaio 5÷6 g di amido con alcuni mL di acqua fredda. Versare la pasta risultante in 1.000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata, aggiungendo per ogni litro di soluzione circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

Acido solforico concentrato, [H_2SO_4] (d = 1,84).

1.5. Procedimento

Porre il campione in esame, previamente aerato a saturazione per circa 20 minuti e mantenuto intorno ai 20°C, in almeno due bottiglie da 300 mL. Riempire le bottiglie sino a circa 1 cm al di sopra dell'inizio del cono a smeriglio. Dopo circa 15 minuti determinare l'ossigeno disciolto in una delle bottiglie secondo le modalità descritte di seguito e porre l'altra o le altre in termostato a 20°C per 5 giorni, in completa oscurità. Al termine del periodo d'incubazione determinare l'ossigeno disciolto residuo secondo le modalità indicate di seguito.

1.5.1. Determinazione dell'ossigeno disciolto
Aggiungere al campione, contenuto in una bottiglia con tappo a smeriglio, 2 mL di soluzione di solfato di manganese(II) e 2 mL di soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide, avendo cura di introdurre quest'ultima ben al di sotto della superficie del liquido. Chiudere la bottiglia eliminando le bolle d'aria ed agitare invertendo molte volte la bottiglia; ripetere l'agitazione una seconda volta dopo che il precipitato si è depositato lasciando il liquido sovrastante limpido. Quando il precipitato si è nuovamente depositato, lasciando almeno 100 mL di liquido limpido, aprire la bottiglia e aggiungere 2 mL di acido solforico concentrato, avendo cura di farlo fluire lungo il collo della bottiglia. Se il campione contiene ferro(III) fino a 2.000 mg L^{-1}, aggiungere, prima di acidificare, 1 mL di soluzione di fluoruro di potassio. Richiudere la bottiglia ed effettuare il mescolamento capovolgendola varie volte finché lo iodio non sia uniformemente distribuito. Scartare dalla soluzione risultante un volume esatto (almeno 100 mL) e titolare il liquido rimasto nella bottiglia di incubazione con la soluzione di tiosolfato di sodio 0,0125N, fino a un colore giallo paglierino. Aggiungere la salda d'amido e continuare a titolare fino a scomparsa del colore azzurro.

1.6. Espressione dei risultati
L'ossigeno disciolto espresso in mg L^{-1} ed approssimato all'unità è dato da:

$$\text{Ossigeno disciolto (mg L}^{-1}) = a \cdot N \cdot f \cdot 8000 / V$$

dove:

a = mL di soluzione di tiosolfato di sodio, utilizzati nella titolazione;
V = volume di campione in mL, utilizzato per la titolazione;
N = normalità della soluzione di tiosolfato di sodio;
f = fattore di correzione per il volume dei reagenti introdotti nella bottiglia d'incubazione ed è uguale a: B/(B-b)

dove:

B = volume in mL della bottiglia adoperata;
b = volume totale in mL dei reattivi impiegati per la precipitazione.

Se X e Y sono le concentrazioni di ossigeno disciolto nel campione rispettivamente prima e dopo l'incubazione del campione stesso, il BOD_5 si ricava dalla seguente espressione:

$$BOD_5(\text{mg L}^{-1}\ O_2) = X - Y$$

1.7. Precisione ed accuratezza
La precisione del metodo non è indicata.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

RICHIESTA CHIMICA DI OSSIGENO (COD)

1. Determinazione volumetrica

1.1. Principio del metodo

Il metodo prevede l'ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche, presenti in un campione d'acqua, mediante una soluzione di bicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento, come catalizzatore dell'ossidazione. L'eccesso di bicromato viene titolato con una soluzione di solfato di ammonio e ferro(II). La concentrazione delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili, nelle condizioni del metodo, è proporzionale alla quantità di bicromato di potassio consumato.

Il metodo è applicabile a condizione che il campione da analizzare, anche dopo eventuale diluizione, soddisfi simultaneamente le condizioni descritte nella Tabella 1 sia per quanto riguarda la concentrazione dei cloruri che il valore del COD.

Tabella 1 - Condizioni di applicabilità del metodo

Casi possibili	Concentrazione di Cl^-	COD ($mg\ L^{-1}$)	Normalità della soluzione di bicarbonato
a	< 2.000	20÷50	0,025
b	< 2.000	> 50	0,25
c*	≥ 2.000	200÷500	0,025
d*	≥ 2.000	> 500	0,25

* In questi casi una diluizione del campione è necessaria per rientrare nei casi a e b.

1.2. Interferenze e cause di errore

Non tutte le sostanze organiche nelle condizioni del metodo vengono ossidate in maniera completa dal bicromato di potassio (ad esempio acido acetico e composti alifatici a catena lineare). L'impiego del solfato di argento, come catalizzatore, consente di rendere più alta la resa della reazione di ossidazione. Anche in queste condizioni alcuni composti (benzene. toluene. xileni, naftalene, antracene, ecc.) vengono ossidati solo parzialmente mentre altri (piridina, ecc.) non subiscono ossidazione. I cloruri interferiscono positivamente in quanto vengono ossidati dal dicromato (1 mg di Cl^- corrisponde, nelle condizioni di analisi, a 0,226 mg di COD). Tale interferenza, alle concentrazioni in Cl^- inferiori a 2.000 mg L^{-1}, viene eliminata addizionando solfato di mercurio(II) nel rapporto in peso $HgSO_4/Cl^- = 10$.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Apparecchiatura in vetro per l'ebollizione a ricadere, consistente in un recipiente in vetro da 500 mL, con collo di vetro smerigliato, connesso ad un condensatore a bolle, alto almeno 60 cm, per evitare perdite significative di prodotti volatili.
- Mantello riscaldante elettrico o analogo dispositivo in grado di portare il campione all'ebollizione.
- Buretta da 25 mL con divisioni da 0,05 mL.

1.4. Reattivi

Utilizzare acqua distillata e reattivi puri per analisi.

Solfato di mercurio(II), [$HgSO_4$] in cristalli.

Solfato d'argento, [Ag_2SO_4] in cristalli.

Soluzione concentrata di bicromato di potassio, 0,25 N. Sciogliere 12,259 g di bicromato di potassio [$K_2Cr_2O_7$], previamente essiccato per 2 ore a 105°C, in acqua e diluire a 1.000 mL in matraccio tarato.

Soluzione diluita di bicromato di potassio, 0,025 N. Diluire a 1.000 mL, in matraccio tarato, 100 mL della soluzione di bicromato di potassio 0,25 N.

Acido solforico concentrato, [H_2SO_4] (d = 1,84).

Soluzione di 1,10-fenantrolina-solfato di ferro(II) (ferroina). Sciogliere 1,485 g di 1,10-fenantrolina monoidrato [$C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$] in circa 80 mL di acqua. Aggiungere 0,695 g di solfato di ferro(II) eptaidrato [$FeSO_4 \cdot 7H_2O$]. Agitare sino a completa dissoluzione e diluire a 100 mL con acqua.

Soluzione concentrata di solfato d'ammonio e ferro(II), 0,25 N. Sciogliere, in 500 mL di acqua, 98 g di solfato di ammonio e ferro(II) esaidrato, [$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$]. Aggiungere 20 mL di acido solforico concentrato, raffreddare e diluire a 1.000 mL. Il controllo del titolo di questa soluzione viene effettuato con una soluzione standard di bicromato di potassio 0,25 N impiegando come indicatore la soluzione di fenantrolina.

Soluzione diluita di soltato d'ammonio e ferro(II) 0,025 N. Diluire a 1.000 mL in matraccio tarato, 100 mL della soluzione di solfato di ammonio e ferro(II) 0,25 N. Il controllo del titolo della soluzione viene effettuato con una soluzione standard di bicromato potassico 0,025 N.

Idrogenoftalato di potassio, [$C_8H_5KO_4$] in cristalli.

1.5. Procedimento

1.5.1. Acque con COD > 50 mg L^{-1}.

Porre in un pallone (o beuta) da 500 mL un campione di 50 mL o, nel caso di COD > 1.000 mg L^{-1}, un'aliquota diluita a 50 mL con acqua. Aggiungere una quantità di solfato di mercurio(II) sufficiente a bloccare i cloruri presenti, 5 mL di H_2SO_4 concentrato ed alcune sferette di vetro da ebollizione. L'acido solforico deve essere aggiunto lentamente ed agitando per avere la completa dissoluzione del solfato di mercurio(II). Il pallone deve essere inoltre raffreddato onde evitare eventuali perdite di materiale volatile. Addizionare 1 g di solfato di argento e, agitando, 25 mL della soluzione 0,25 N di bicromato di potassio. Inserire il refrigerante ed iniziare la circolazione dell'acqua. Infine, lentamente ed agitando, versare 70 mL di acido solforico concentrato. Durante l'aggiunta il pallone deve essere raffreddato con acqua corrente fredda o con acqua e ghiaccio per prevenire la perdita di sostanze organiche volatili. Iniziare il riscaldamento e lasciare bollire per 2 ore. Interrotto il riscaldamento, lasciare raffreddare, lavare bene il refrigerante con acqua in modo da diluire il contenuto del pallone fino ad un volume di 350÷400 mL. Aggiungere 2÷3 gocce di soluzione indicatrice di fenantrolina e titolare l'eccesso di bicromato con la soluzione di solfato di ammonio e ferro(II) 0,25 N fino a viraggio del colore da blu-verde a bruno-rosso. Eseguire in parallelo una prova in bianco sostituendo i 50 mL di campione con 50 mL di acqua.

1.5.2. Acque con COD compreso tra 20 e 50 mg L^{-1}

Il procedimento è lo stesso del precedente, con la sola variante dell'impiego delle soluzioni 0,025 N di bicromato di potassio e 0,025 N di solfato di ammonio e ferro(II) invece che le corrispondenti soluzioni 0,25 N. Poiché potrebbe rivelarsi difficoltoso cogliere il viraggio di colore dell'indicatore, può essere utile determinare il punto finale per via potenziometrica.

1.6. Espressione dei risultati

La richiesta chimica di ossigeno (COD) espressa in mg L^{-1} ed approssimata all'unità viene calcolata applicando la seguente espressione:

$$COD\ (mg\ L^{-1}) = (m_1 - m_2) \bullet N \bullet 8000 / V$$

dove:

m_1	=	mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro(II) consumati nella prova in bianco;
m_2	=	mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro(II) consumati per il campione;
N	=	normalità della soluzione di solfato di ammonio e ferro(II) impiegata;
V	=	mL di campione usati nell'analisi;
8000	=	peso equivalente dell'ossigeno moltiplicato per 1.000, per riferire il dato al volume di 1 litro.

1.7. Precisione ed accuratezza

Campioni contenenti idrogenoftalato di potassio a concentrazioni note comprese rispettivamente tra 160 e 200 mg L^{-1} e cloruri a concentrazioni comprese tra 100 e 1.000 mg L^{-1} presentano valori di deviazione standard relativa inferiori all'11%.

2. Recupero del mercurio nei residui d'analisi

2.1. Principio

I residui della determinazione del COD contengono oltre al mercurio anche cromo, argento e ferro in concentrazioni superiori a quelle permesse dalla normativa vigente.

È possibile ridurre allo stato elementare, mediante idrogeno nascente, il mercurio e l'argento che si separano come amalgama. Cromo e ferro vengono invece precipitati come idrossidi.

2.2. Reagenti

Ferro in polvere o in trucioli. In alternativa si può usare zinco o alluminio.

Soluzione di idrossido di sodio: 450 g L^{-1}. Sciogliere 450 g di idrossido di sodio [NaOH] in acqua e diluire a 1.000 mL.

2.3. Procedimento

Riunire le soluzioni da eliminare in un recipiente di polietilene o di cloruro di polivinile e aggiungere il ferro in polvere o truccioli (o zinco o alluminio) in eccesso rispetto allo stechiometrico. L'operazione va condotta all'aperto e lontano da fiamme libere a causa dello sviluppo di idrogeno.

Attendere per 2÷3 giorni che lo spostamento del mercurio e dell'argento sia completo e che l'amalgama si depositi sul fondo del recipiente. Sifonare il liquido limpido per un'eventuale successiva separazione del cromo e del ferro, che potrebbero ancora essere presenti.

Filtrare il fango residuo (1÷2 litri) su carta a filtrazione rapida avendo cura di lavare il residuo molto bene con acqua per togliere l'acidità residua che impedirebbe una completa essiccazione del campione. L'amalgama viene infine essiccata all'aria.

Accumulare una quantità di amalgama tale da giustificare un eventuale recupero del mercurio e dell'argento.

Correggere il pH della soluzione sifonata fino al valore di 7,5÷8 con soluzione di idrossido di sodio per ottenere la precipitazione degli idrossidi di cromo e di ferro che, dopo filtrazione, possono essere inviati alla discarica.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

SALI TOTALI DISCIOLTI

1. Determinazione gravimetrica

1.1. Principio del metodo

Per Sali Totali Disciolti (o residuo filtrabile) si intendono tutte le sostanze non trattenute da un filtro a 0,45 μm e che non sono volatilizzate durante il processo d'essiccamento.
Il campione di acqua in esame viene opportunamente filtrato e successivamente il liquido viene evaporato a bagnomaria in una capsula previamente pesata. Il residuo dell'evaporazione viene fatto essiccare a peso costante a 103÷105 °C o a 179÷181 °C. L'aumento in peso della capsula contenente il residuo, rispetto a quella vuota, rappresenta il contenuto in sali disciolto definito anche come "residuo filtrabile".
Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico.

1.2. Interferenze e cause d'errore

I residui essiccati a 103÷105 °C possono contenere non solo acqua di cristallizzazione, ma anche acqua di occlusione meccanica. A questa temperatura, alla perdita di anidride carbonica contribuisce sostanzialmente la trasformazione dei bicarbonati in carbonati; inoltre le perdite di materiale organico per volatilizzazione saranno molto esigue se la temperatura sarà mantenuta costante. Poiché l'espulsione di acqua di occlusione è soltanto parziale a 105 °C, il raggiungimento del peso costante, condizione determinante per una buona misura, non è sempre ottenibile rapidamente.
Il residuo essiccato a 179÷181 °C perderà quasi tutta l'acqua di occlusione, ma parte dell'acqua di cristallizzazione potrà rimanere, specialmente se sono presenti solfati; a loro volta le sostanze organiche verranno rimosse per volatilizzazione, ma non saranno completamente distrutte. I bicarbonati verranno trasformati in carbonati e questi potranno essere decomposti parzialmente in ossidi e sali basici.
In genere, evaporando ed essiccando il campione di acqua a 179÷181 °C, si ottengono valori che sono maggiormente confrontabili con quelli che risultano dalla somma delle concentrazioni dei vari sali minerali singolarmente determinate. La temperatura di essiccamento dovrà essere scelta in base al tipo di acqua da esaminare.
Acque che hanno un basso contenuto di sostanze organiche e di sali minerali possono essere esaminate ad entrambe le temperature; acque contenenti, invece, quantità notevoli di sostanze organiche o il cui pH superi il valore di 9 devono essere essiccate alla temperatura più alta. In ogni caso, nel risultato di analisi deve essere indicata la temperatura di essiccamento scelta.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Apparecchio per filtrazione adeguato al tipo di filtro scelto.
- Membrane filtranti con diametro di 50 mm o 100 mm e pori di diametro non superiore a 0,45 μm.
- Carta da filtro di tipo duro, senza ceneri, capace di trattenere precipitati fini, in dischi di diametro da 55 mm.
- Centrifuga da laboratorio da 3.000÷4.000 giri al minuto.
- Stufa munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura entro 2 °C.
- Essiccatore provvisto di un indicatore colorato per segnalare il grado di esaurimento della miscela essiccante.
- Bilancia analitica con 0,1 mg di sensibilità.
- Capsule di 150÷200 mL di capacità costituite dai seguenti materiali:
  - platino: generalmente soddisfacente per ogni tipo di test;
  - nichel: soddisfacente se il residuo non deve essere incenerito;

- porcellana, silice o pyrex: soddisfacente per campioni con pH al di sotto di 9.

Si fa presente che la porcellana, la silice ed il vetro pyrex vengono corrosi da acque ad elevato valore di pH. Il platino è il più soddisfacente tra i materiali da utilizzare per capsule poiché è quasi del tutto inattaccabile dai sali minerali e contemporaneamente non subisce variazioni di peso degne di rilievo durante le operazioni di riscaldamento.

1.4. Reattivi

In questo metodo non è previsto l'uso di reattivi.

1.5. Procedimento

1.5.1. Filtrazione

Filtrare una porzione del campione attraverso la membrana filtrante.
Nel caso di acque che richiedono tempi di filtrazione eccessivamente lunghi, operare una filtrazione preliminare su carta da filtro di tipo duro, che consente una filtrazione rapida, trattenendo al contempo la maggior parte dei solidi sospesi. Eseguire quindi la filtrazione sulla membrana filtrante.

1.5.2. Centrifugazione

Centrifugare il campione per 15 minuti, mantenendo 3.000 g (g = accelerazione di gravità: il valore di 3.000 g si può ottenere variando il numero di giri al minuto a seconda del tipo di centrifuga disponibile). Decantare per sifonamento il liquido sovrastante senza perturbare il materiale depositato e lasciando al di sopra del deposito stesso una quantità di liquido dell'altezza di circa 10 mm.

1.5.3. Misura

Trasferire un volume C di liquido limpido, ottenuto per filtrazione o per centrifugazione, in una capsula precedentemente tarata ed evaporare a bagnomaria. Dopo completa evaporazione dell'acqua dal residuo, trasferire la capsula in stufa alla temperatura di 103÷105 °C oppure di 179÷181 °C. Essiccare fino a peso costante (si considera peso costante quello ottenuto quando la variazione di peso tra due serie successive di riscaldamento, raffreddamento e pesata, non superi il valore di 0,5 mg).
L'essiccamento per un lungo periodo può eliminare la necessità di un controllo per il peso costante, ma in tal caso occorre essiccare la capsula per tutta una notte, oppure determinare sperimentalmente il tempo richiesto per ottenere un peso costante con un dato tipo di campione, qualora si abbia da esaminare un certo numero di campioni dello stesso tipo.
Raffreddare brevemente la capsula all'aria prima di porla ancora calda nell'essiccatore e completare successivamente il raffreddamento in atmosfera secca. È opportuno non sovraccaricare l'essiccatore e lasciare sufficiente spazio disponibile affinché tutte le capsule possano poggiare sul piatto dell'essiccatore, in modo che non accada che vengano a contatto reciprocamente o con le pareti dell'essiccatore stesso.
Pesare la capsula non appena sia completamente raffreddata. Il residuo non deve rimanere per molto tempo nell'essiccatore, poiché qualche tipo di residuo, specialmente quelli portati a 180 °C, può risultare molto igroscopico e può rimuovere umidità da un essiccatore la cui atmosfera non sia completamente secca.

1.6. Espressione dei risultati

Riportare l'aumento in peso della capsula piena rispetto a quella vuota come "Sali Totali Disciolti alla temperatura di x °C". Questo valore si esprime in mg L^{-1} approssimato all'unità.
È necessario indicare sempre il tipo di filtro usato.
La concentrazione in sali disciolti del campione si calcola mediante la formula:

$$\text{Sali Totali Disciolti (STD mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(p_1 - p_0) \bullet 1.000}{C}$$

dove:

p_1 = peso della capsula piena;
p_0 = peso della capsula vuota;
C = volume del campione filtrato (o centrifugato) prelevato per l'analisi (mL).

1.7. Precisione ed accuratezza

La precisione con cui la quantità totale di sali disciolti è determinata dipende dalla bilancia analitica usata per le pesate. L'accuratezza non può essere stimata poiché la quantità di solidi disciolti determinata con questo metodo è una quantità arbitraria definita dalla procedura utilizzata. I valori determinati quindi possono non corrispondere con il valore teorico della quantità di sali determinata all'analisi chimica.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992); *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).
CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*. Quaderno 100 (Roma).

PARAMETRI CHIMICI

SOLIDI TOTALI SOSPESI

1. Determinazione gravimetrica

1.1. Principio del metodo

Con il termine Solidi Totali Sospesi (o residuo non filtrabile) s'intendono tutte quelle sostanze che non sono disciolte nel campione di acqua da esaminare e che vengono trattenute da un filtro, quando il campione stesso viene sottoposto a filtrazione.
Un'aliquota del campione di acqua viene filtrato su un filtro a peso noto ed il filtro con il contenuto viene fatto essiccare a 103÷105 °C o a 179÷181 °C. L'aumento in peso del filtro rappresenta il contenuto in solidi sospesi definito anche come "residuo non filtrabile".
Il metodo è applicabile alle acque naturali e di scarico.

1.2. Interferenze e cause d'errore

La quantità ed il tipo di materiale sospeso nel campione suggeriranno se i solidi sospesi debbano essere determinati direttamente o debbano essere ottenuti per differenza tra i solidi totali e quelli disciolti. Se il tempo richiesto per la filtrazione su un filtro da 0,45 µm risulta troppo lungo (superiore ad 1 h) i solidi sospesi totali debbono essere valutati per differenza tra il valore dei solidi totali e quelli disciolti, operando la separazione per centrifugazione. Per ragioni di praticità nel caso di acque che richiedono tempi di filtrazione eccessivamente lunghi, conviene operare la filtrazione stessa su un tipo di carta da filtro che consenta una filtrazione rapida, trattenendo al contempo la maggior parte dei solidi sospesi (si suggerisce l'impiego della carta da filtro Whatman GF/C). Va ricordato che seguendo questa procedura si possono ottenere valori di solidi sospesi diversi e comunque in lieve difetto in funzione della percentuale di solidi di natura colloidale; al contempo si ottengono valori di solidi disciolti in lieve eccesso.

1.3. Apparecchiature

- Apparecchio per filtrazione adeguato al tipo di filtro scelto.
- Membrane filtranti con diametro di 50 mm o 100 mm e pori di diametro non superiore a 0,45 µm.
- Carta da filtro di tipo duro, senza ceneri, capace di trattenere precipitati fini, in dischi di diametro da 55 mm.
- Centrifuga da laboratorio da 3.000÷4.000 giri al minuto.
- Stufa munita di termostato capace di mantenere la temperatura entro 2 °C.
- Essiccatore provvisto di un indicatore colorato per segnalare il grado di esaurimento della miscela essiccante.
- Bilancia analitica con 0,1 mg di sensibilità.
- Capsule di 150÷200 mL di capacità costituite dai seguenti materiali:
  - platino: generalmente soddisfacente per ogni tipo di test;
  - nichel: soddisfacente se il residuo non deve essere incenerito;
  - porcellana, silice o pyrex: per campioni con pH al di sotto di 9.

Si fa presente che la porcellana, la silice ed il vetro pyrex vengono corrosi da acqua ad elevato valore di pH. Il platino è il più soddisfacente tra i materiali da utilizzare per capsule poiché è quasi del tutto inattaccabile dai sali minerali e contemporaneamente non subisce variazioni di peso degne di rilievo durante le operazioni di riscaldamento.

1.4. Reattivi

In questo metodo non è previsto l'uso di reattivi.

1.5. Procedimento

1.5.1. Filtrazione

Il filtro deve subire un trattamento preliminare di essiccamento in stufa alla stessa temperatura che si intende usare con il campione in esame. Un criterio abbastanza valido nella scelta del volume del campione da filtrare può essere fornito dalla misura della torbidità. Se il campione ha una torbidità di 50 mg L^{-1} (SiO_2) o meno occorre filtrarne 1.000 mL; se la torbidità è al di sopra di 50 mg L^{-1} (SiO_2) occorre filtrarne una quantità capace di fornire da 50 a 100 mg di solidi sospesi. Quando la quantità di solidi sospesi rimasta nel filtro è maggiore di 100 mg, sarà opportuno procedere anche ad una valutazione degli stessi per differenza tra "solidi totali" e "solidi disciolti", alla quale va data maggiore fiducia.

Se il campione non è facilmente filtrabile, si possono anche seguire queste procedure:

- prefiltrare il campione in esame su carta da filtro (Whatman 40) e filtrare il liquido risultante su membrana filtrante da 0,45 µm. Determinare il contenuto in solidi sospesi totali dalla somma dei due residui;
- trasferire il campione in tubi da centrifuga, e centrifugare per 5÷10 minuti in modo da addensare i solidi. Impiegando il liquido chiarificato trasferire nei tubi da centrifuga i solidi eventualmente rimasti sul fondo o sulle pareti del beaker contenente il campione in origine. Centrifugare nuovamente. Versare il liquido chiarificato su filtro; quindi trasferire quantitativamente il solido addensato sul fondo dei tubi da centrifuga, lavando con una parte del filtrato. Dopo filtrazione, trasferire il filtro con il suo contenuto in una stufa a temperatura di 103÷105 o 179÷181 °C ed essiccare fino a peso costante.

1.5.2. Centrifugazione

Centrifugare per 15 minuti, mantenendo 3.000 g (g = accelerazione di gravità; il valore di 3.000 g si può ottenere variando il numero di giri al minuto a seconda del tipo di centrifuga disponibile) un volume di acqua tale che si possano raccogliere da 50 a 100 mg di sostanze sospese. Decantare per sifonamento il liquido sovrastante senza perturbare il materiale depositato e lasciando al di sopra del deposito stesso una quantità di liquido dell'altezza di circa 10 mm. Travasare il sedimento in una capsula di peso noto e sciacquare il tubo della centrifuga per due-tre volte con una piccola quantità di acqua distillata. Centrifugare dopo ogni aggiunta per 15 minuti a 3.000 g. Introdurre nella capsula le acque di lavaggio ed i fondi del lavaggio stesso. Evaporare l'acqua della capsula a bagnomaria ed essiccare in stufa alla temperatura di 103÷105 o 179÷181 °C per 1 h. Lasciare raffreddare in essiccatore fino a peso costante.

1.6. Espressione dei risultati

Riportare l'aumento in peso del filtro o della capsula piena rispetto a quella vuota come "Solidi Totali Sospesi alla temperatura di x °C". Questo valore si esprime in mg L^{-1} approssimato all'unità.

È necessario indicare sempre il tipo di filtro usato.

La concentrazione in solidi sospesi del campione si calcola mediante la formula:

$$\text{Solidi Totali Sospesi (STS mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(p_1 - p_0) \cdot 1.000}{C}$$

dove:

p_1 = peso del filtro o della capsula piena;
p_0 = peso del filtro della capsula vuota;
C = volume del campione filtrato (o centrifugato) prelevato per l'analisi (mL).

1.7. Precisione ed accuratezza

La precisione con cui la quantità totale di solidi sospesi viene determinata dipende dalla bilancia analitica usata per le pesate. L'accuratezza non può essere stimata poiché la quantità di solidi sospesi determinata con questo metodo è una quantità arbitraria definita dalla procedura utilizzata.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992); *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* XVIII ed. (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

TEMPERATURA

1. Determinazione diretta

1.1. Principio del metodo

La temperatura dell'acqua si misura immergendo l'elemento sensibile dello strumento ed attendendo il raggiungimento dell'equilibrio termico prima di effettuare la lettura.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, di scarico e di mare.

1.2. Interferenze e cause d'errore

Il metodo è esente da interferenze.

1.3. Apparecchiature

- Termometro, scala Celsius, graduato a 1/10 di °C
- Termometro a pozzetto, scala Celsius, graduato a 1/10 di °C.
- Termistori.

1.4. Reattivi

Il metodo non prevede l'uso di reattivi.

1.5. Procedimento

1.5.1. Misura con termometro a mercurio

Immergere il bulbo del termometro e parte della colonna termometrica nell'acqua attendendo il raggiungimento dell'equilibrio termico; a questo punto effettuare la lettura.
È opportuno controllare all'inizio dell'uso e poi periodicamente il termometro, eseguendo una misura di temperatura in parallelo con un termometro di precisione munito di certificato di garanzia.

1.5.2. Misura con termometro a pozzetto

Nel caso che il prelievo del campione venga eseguito su acque cui si può accedere con difficoltà, si può ricorrere al termometro a pozzetto.
Esso è costituito da un termometro fissato all'interno di un'intelaiatura metallica terminante in un bicchierino metallico (pozzetto) in cui pesca il bulbo. Il termometro viene generalmente calato in acqua appeso ad una cordicella. Durante l'immersione, dato che il termometro è opportunamente zavorrato, il bicchierino si riempie d'acqua, permettendo così la determinazione della temperatura una volta estratto lo strumento dall'acqua in esame, senza che la misura venga perturbata per il tempo intercorrente per il recupero dello strumento e la lettura della temperatura. Per la taratura vale quanto specificato per il termometro a mercurio.

1.5.3. Termistori

Nei dispositivi a termistori l'elemento sensibile è una resistenza il cui coefficiente di temperatura, di segno negativo, è molto elevato (in modulo circa il 4,4% per grado centigrado a 25 °C). La resistenza del termistore è misurata in modo diretto mediante un ponte di Wheatstone; da tale valore si risale alla temperatura mediante un grafico di calibrazione resistenza/temperatura.
La calibrazione di un termistore si esegue ponendo il dispositivo in un termostato ad acqua, a temperatura regolabile, ed immergendo nello stesso termostato un termometro calibrato al decimo di grado; si esegue quindi la lettura della resistenza a varie temperature.
Per eseguire la misura della temperatura in un corpo idrico a varie profondità il termistore è collegato ad un cavo su cui si segnano le distanze in metri. Si cala quindi il cavo e si registrano i valori misurati alle varie profondità dopo che è stato raggiunto l'equilibrio per ogni posizione. È conveniente eseguire la misura sia in discesa che in risalita.

1.6. Espressione dei risultati

Tutti i risultati vengono espressi in gradi e decimi di grado della scala Celsius.

1.7. Precisione ed accuratezza

L'accuratezza, espressa come errore assoluto, è di 0,1 °C per i termometri a 1/10 di °C.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

ALLUMINIO

1. Determinazione per assorbimento atomico (acque dolci)

1.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla formazione di un composto tra l'alluminio e l'8-idrossichinolina (ossina) a pH 8 e sua estrazione in metilisobutilchetone (MIBK). La fase organica viene aspirata direttamente nella fiamma ossido di diazoto-acetilene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 309,3 nm.
Il metodo consente la determinazione dell'alluminio in acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,05 a 1 mg L^{-1}. Concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo opportunamente il campione in esame.

1.2. Interferenze e cause di errore

Il magnesio può interferire negativamente in quanto al pH di estrazione può precipitare l'ossinato di magnesio col quale coprecipita anche l'alluminio, se si attende per più di tre minuti. Se si usa l'accortezza di procedere all'estrazione dell'ossinato di Al nel più breve tempo possibile non si verifica alcuna interferenza anche con concentrazioni di magnesio superiori a 1 g L^{-1}.
Metalli pesanti, a concentrazioni superiori a 1 mg L^{-1}, possono provocare interferenze negative; per eliminare quindi la possibilità di valori in difetto occorre aggiungere a 100 mL di campione 2 mL di una soluzione di cloruro di o-fenantrolina al 5%, agitare per 1 minuto, lasciare a riposo ancora per 1 minuto e quindi proseguire come descritto al punto 1.5.2.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio. La vetreria deve essere accuratamente lavata con HNO_3 diluito e caldo e sciacquata abbondantemente con acqua.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico munito di bruciatore per fiamma ossido di diazoto-acetilene e corredato di tutti gli altri accessori necessari.
- pH-metro, corredato di una coppia di elettrodi vetro-calomelano.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere distillata e deionizzata.

Acido acetico glaciale [CH_3COOH] (d = 1,05)

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).

Soluzione di acido cloridrico diluito (1+99). Aggiungere 1 volume di soluzione di acido cloridrico concentrato a 99 volumi di acqua.

Soluzione di ammoniaca concentrata [NH_4OH] (d = 0,9).

Soluzione di ammoniaca diluita (1+1). Aggiungere 1 volume di soluzione di ammoniaca concentrata a 1 volume di acqua.

Soluzione di 8-idrossichinolina (ossina). Sciogliere 2 g di 8-idrossichinolina [C_9H_7NO] in 20 mL di acqua, aggiungere 6 mL di acido acetico glaciale e diluire a 100 mL con acqua.

Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare il MIBK con acqua prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perché il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro scuro.

Soluzione tampone. Sciogliere 200 g di acetato d'ammonio [CH_3COONH_4] e 70 mL di soluzione di ammoniaca concentrata in acqua e diluire la soluzione a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard concentrata di alluminio (1 mL = 1 mg Al). Pesare 1 g di alluminio e sciogliere, in beaker coperto, con 15 mL di acido cloridrico concentrato, scaldando leggermente. Quando la soluzione è completa, trasferire quantitativamente in matraccio tarato da 1.000 mL e portare a volume con acqua.

Soluzione standard diluita in alluminio (1 mL = 0,01 mg Al). Diluire 10 mL della soluzione concentrata a 1.000 mL con acqua. Preparare questa soluzione al momento dell'uso.

1.5. Procedimento

Eseguire tutte le operazioni consigliate nel manuale dello strumento e selezionare la lunghezza d'onda di 309,3 nm.

1.5.1. Taratura

È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio ed alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.

Porre 100 mL di almeno quattro soluzioni di alluminio preparate partendo dalla soluzione standard diluita in altrettanti imbuti separatori da 250 mL. Per il bianco dei reattivi usare 100 mL di acqua. La concentrazione di alluminio nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ciascun imbuto 2 mL di soluzione di 8-idrossichinolina, 10 mL di soluzione tampone e agitare bene dopo ogni aggiunta.

Aggiungere immediatamente 10 mL di MIBK, agitare per 15 secondi e attendere la separazione delle due fasi. Scaricare la fase acquosa e raccogliere la fase organica in una beuta da 10 mL munita di tappo di vetro smerigliato.

Regolare la fiamma aspirando il metilisobutil-chetone (MIBK), quindi aspirare la soluzione in fase organica in precedenza raccolta ed effettuare la lettura allo spettrofotometro di assorbimento atomico.

Tracciare il grafico di taratura, ponendo in ascissa le concentrazioni di Al, espresse in mg L^{-1}, ed in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del bianco dei reattivi.

1.5.2. Determinazione

Porre in un imbuto separatore da 250 mL 100 mL di campione (o un'aliquota inferiore diluita a 100 mL), portati a pH 4 utilizzando le soluzioni diluite di acido cloridrico e/o ammoniaca. Aggiungere in ciascun imbuto 2 mL di soluzione di 8-idrossichinolina, 10 mL di soluzione tampone e agitare bene dopo ogni aggiunta.

Aggiungere immediatamente 10 mL di MIBK, agitare per 15 secondi e attendere la separazione delle due fasi. Scaricare la fase acquosa e raccogliere la fase organica in una beuta da 10 mL munita di tappo di vetro smerigliato.

Regolare la fiamma aspirando il metilisobutil-chetone (MIBK), quindi aspirare la soluzione in fase organica in precedenza raccolta ed effettuare la lettura allo spettrofotometro di assorbimento atomico.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore dell'assorbanza, corretta del valore del bianco, tramite il grafico di taratura, si risale alla concentrazione dell'alluminio nel campione, espressa in mg L^{-1}.

1.7. Precisione ed accuratezza

Prove effettuate da quattro differenti laboratori su campioni di acque naturali e di scarico, prima e dopo aggiunta di quantità note di alluminio (in modo da ottenere campioni con concentrazioni di 1 mg L^{-1}) hanno dato valori della deviazione standard relativa inferiori al 2%, mentre i recuperi relativi delle quantità aggiunte sono risultati compresi tra il 99 e il 100%.

2. Determinazione colorimetrica (acque salmastre e marine)

2.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso blu tra l'alluminio e il violetto pirocatechina ad un pH ottimale di 6,1÷6,2. L'acido ascorbico, usato come riducente, ha una funzione tampone con l'acetato ammonico. L'assorbanza del complesso viene misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 582 nm.

Il metodo ha una risposta lineare tra 0,005 e 0,140 mg L^{-1}. Il limite di rivelabilità è pari a 0,3 µg L^{-1} equivalente ad un'assorbanza netta di 0,011 in celle da 10 cm di cammino ottico. Concentrazioni più elevate possono essere determinate con celle a cammino ottico inferiore.

2.2. Interferenze e cause di errore

L'interferenza negativa dei fluoruri è virtualmente eliminata addizionando ioni magnesio che formano un complesso relativamente stabile con i fluoruri. È opportuna l'addizione di 1 mg L^{-1} di Mg^{++}, sebbene il complesso MgF^{+} è naturalmente presente nell'acqua marina. Il ferro forma complessi colorati con il reagente, che possono essere minimizzati complessandolo con fenantrolina. La fenantrolina utilizzata è sufficiente per 2,5 mg L^{-1} di ferro. Anche il titanio trivalente forma complessi colorati con il violetto pirocatechina, ma per l'acqua di mare questa interferenza può essere ignorata. L'allumino è rapidamente rilasciato dai recipienti di vetro, è quindi necessario l'impiego di contenitori di polietilene o PVC.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Recipienti in polietilene o PVC.
- Cilindri graduati in polietilene o PVC da 100 mL con tappo dello stesso materiale.
- pH metro con elettrodi vetro-calomelano.
- Spettrofotometro predisposto per vaschette a cammino ottico fino a 10 cm.

2.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere distillata o deionizzata. I reattivi devono essere stoccati in contenitori di polietilene o PVC.

Soluzione di acido solforico [H_2SO_4] 4,5 M. Aggiungere cautamente 250 mL di acido solforico concentrato (d = 1,84) a 750 mL di acqua. Lasciare raffreddare e diluire a 1.000 mL.

Soluzione di idrossido di sodio [NaOH] 2 M. Disciogliere 80 g di idrossido di sodio in acqua e diluire a 1.000 mL.

Soluzione di acido ascorbico [$C_6H_8O_6$]. Disciogliere 7 g di acido ascorbico in 100 mL di acqua. Se conservata in frigorifero, la soluzione è stabile per settimane e può essere usata fino a che rimane incolore.

Soluzione di 1,10-fenantrolina [$C_{12}H_8N_2 \bullet H_2O$]. Disciogliere 0,2 g di reagente in 100 mL di acqua a 80°C circa. La soluzione è stabile.

Reagente misto. Miscelare volumi uguali delle soluzioni di acido ascorbico e di 1,10-fenantrolina. Se necessario aggiungere una piccola quantità di soluzione standard di alluminio. Conservata in frigorifero la miscela è stabile per circa due settimane.

Reagente PV. Disciogliere 75 mg di violetto pirocatechina [$C_{19}H_{14}O_7S$] in circa 20 mL di acqua, infine diluire a 200 mL con acqua. Conservato in frigorifero, il reagente è stabile per mesi.

Soluzione di acetato ammonico [CH_3COONH_4]. Preparare una soluzione pressoché satura dissolvendo 100 g di acetato ammonico in 100 mL di acqua.

Soluzione di solfato di magnesio [$MgSO_4 \bullet 7H_2O$]. Disciogliere 75 g di solfato di magnesio eptaidrato e 0,75 g di bicarbonato di sodio [$NaHCO_3$] in 110 mL di acqua. Il volume (150 mL) contiene 50 g di Mg^{++} L^{-1}.

Soluzione di EDTA. Disciogliere 300 mg di sale bisodico dell'acido etilendiammino tetracetico in 20 mL di acqua e neutralizzare con 0,5 mL di soluzione di NaOH 2 M.

Soluzione standard di alluminio (1 mL = 0,1 mg di Al). Disciogliere 176 mg di solfato di potassio e alluminio dodecaidrato [$KAl(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$] in acqua. Aggiungere 0,2 mL di soluzione di H_2SO_4 4,5 M e diluire a 100 mL con acqua.

2.5. Procedimento

2.5.1. Taratura

A 50 mL di acqua aggiungere 1 mL di ciascuno dei seguenti reagenti: soluzione di EDTA, reagente misto, reagente PV e soluzione di acetato ammonico. Mescolare vigorosamente tra un'aggiunta e l'altra. Ad una seconda porzione della stessa acqua aggiungere 1 mL di soluzione di solfato di magnesio al posto della soluzione di EDTA e tutti gli altri reagenti citati, mescolando vigorosamente tra un'aggiunta e l'altra. Dopo 40÷50 minuti si misurano entrambe le assorbanze a 582 nm contro acqua nella cella di riferimento.

Nel campione contenente EDTA si ottiene il colore del reagente PV al pH di reazione. L'assorbanza netta deve avvicinarsi a 0,12.

Nel secondo campione l'alluminio è in grado di reagire. Se l'assorbanza del campione è inferiore a 0,30, è richiesta una piccola costante addizione di alluminio affinché la curva standard sia conforme alla legge di Lambert-Beer da 5 µg L^{-1} in poi. L'ammontare di alluminio richiesto può essere comodamente incorporato nel reagente misto: da 0,05 a 0,10 mL di soluzione standard per 50 mL di reagente misto. La taratura finale si ottiene con aliquote di 50 mL di acqua contenti 0 e 10 µg L^{-1} di Al, aggiungendo i reagenti come descritto sopra per il secondo campione.

Il fattore F si calcola con la seguente espressione:

$$F(10cm) = 10/(A_{st}-A_b)$$

dove A_{st} è l'assorbanza dello standard e A_b è l'assorbanza del bianco.

Il valore di F deve essere vicino a 27.

Per il calcolo è anche richiesto il "valore zero" della reazione. Questo valore si ottiene dalla relazione $A_z=A_b-A_w$ dove A_b è l'assorbanza di taratura e A_w è l'assorbanza che si ottiene sostituendo l'acqua allo standard. È opportuno ripetere questa lettura quando si rinnova anche uno soltanto dei quattro principali reagenti.

Per ottenere il fattore F e il "valore zero" dovendo operare su campioni previamente acidificati, ripetere la taratura finale usando 50 mL di acqua acidificata e alcalinizzando il reagente PV con 0,45 mL di idrossido di sodio per ottenere il pH corretto. È raccomandabile un controllo con un pH-metro.

2.5.2. Determinazione

Se i campioni non sono stati previamente acidificati, la determinazione deve essere condotta entro un'ora dal campionamento.

Porre 50 mL di campione in un contenitore plastico di volume adeguato, addizionare 1 mL ciascuno dei reagenti: solfato di magnesio, reagente misto, reagente PV e acetato ammonico. Mescolare vigorosamente tra un'addizione e l'altra. Per correggere le interferenze del ferro e della torbidità addizionare 1 mL di reagente misto e 3 mL di acqua in una seconda aliquota di 50 mL di campione. Dopo 40÷50 minuti misurare l'assorbanza contro acqua in celle da 10 cm a 582 nm. Per campioni previamente acidificati, addizionare 0,45 mL di idrossido di sodio come quinto reagente. Preparare una seconda aliquota da 50 mL, per la correzione del colore e della torbidità (A_{ct}) addizionando 1 mL di reagente misto, 0,45 mL di idrossido di sodio e 3 mL di acqua.

2.6. Espressione dei risultati

Calcolare la concentrazione dell'alluminio espressa in mg L^{-1} con l'espressione:

$$\text{Alluminio reattivo (mg } L^{-1}) = 1.000 \bullet F \bullet (A_s - A_z - A_{ct})$$

dove:

F	=	fattore di taratura;
A_s	=	assorbanza del campione;
A_z	=	"valore zero" di taratura;
A_{ct}	=	assorbanza del campione di correzione.

La determinazione dell'alluminio con reagente PV fornisce la concentrazione del metallo in forma solubile e colloidale inorganica. È anche possibile che alcuni deboli complessi organici dell'alluminio possano reagire.

2.7. Precisione ed accuratezza

La precisione, per quantità minori 1 µg L^{-1}, è pari a ±15% mentre è pari a ±5% per quantità superiori.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

GRASSHOFF K., EHRHARDT M. KREMLING K. (1983), *Methods of Seawater Analysis*. II Ed. Verlag.Chemie.

AZOTO AMMONIACALE

1. Determinazione colorimetrica al blu indolfenolo

1.1. Principio del metodo

L'ammoniaca viene determinata utilizzando il metodo colorimetrico al blu indofenolo. Il metodo si basa sulla reazione, in soluzione alcalina (pH 10,3÷10,8), tra ammoniaca e ipoclorito con formazione di monocloroammina che, in presenza di fenolo, di un opportuno catalizzatore e di un eccesso di ipoclorito, forma un complesso colorato, noto come blu indofenolo. L'intensità di tale complesso viene misurata con uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 635 nm.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, dolci, salmastre o marine, alle acque potabili e agli scarichi industriali e domestici.
Il metodo può essere impiegato per concentrazioni di azoto ammoniacale comprese tra 0,04 e 1 mg L^{-1}.

1.2. Interferenze e cause di errore

Tra le sostanze inorganiche, gli ioni mercurio interferiscono impedendo la reazione, di conseguenza i campioni non devono essere conservati con $HgCl_2$. Interferenze sono state inoltre osservate in presenza di ferro, rame e zinco a concentrazioni 100 volte superiori a quella dell'ammoniaca. Nel caso di acque salmastre o marine gli ioni calcio e magnesio sono presenti in quantità sufficienti per causare problemi di precipitazione che possono essere eliminati con l'aggiunta di una soluzione di citrato di sodio. Non interferiscono i comuni sali di sodio, potassio e bario. Il bromo interferisce perché reagisce con il fenolo per dare tribromofenolo. L'urea non interferisce fino a concentrazioni di 1 g L^{-1}, morfolina: 10 mg L^{-1}, cicloesilammina: 80 mg L^{-1}, idrazina: 40 mg L^{-1}, n-ottadecilammina: 8 mg L^{-1}.
Il pH deve essere compreso tra 10,4 e 11,3 poiché la formazione di blu indofenolo è quantitativa solo in questo intervallo di pH. A valori di pH superiori a 11,3, l'ammoniaca viene parzialmente ossidata a nitrito e, a valori più bassi di 10,4 la costante di formazione del complesso colorato è minore e la reazione non è quantitativa.
È opportuno infine effettuare la determinazione entro breve tempo dal prelievo, se il ritardo dell'analisi supera 1 ora i campioni devono essere conservati in bottiglie di polietilene, al buio e in luogo fresco. Per sopprimere le attività biologiche è necessario procedere ad un rapido congelamento o ad un'aggiunta di una soluzione alcoolica di fenolo al 10%, 0,5 mL per 100 ml di campione.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio preventivamente lavata con una soluzione acida di acido cloridrico (1:1) e quindi abbondantemente risciacquata in acqua bidistillata preparata di recente ed esente da ammoniaca.
- Spettrofotometro che consenta misure a 635 nm, munito di celle con cammino ottico da 1 e 10 cm.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi utilizzati devono essere puri per analisi. L'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata. In quest'ultimo caso occorre tener presente che alcune resine scambiatrici possono rilasciare sostanze organiche contenenti ammoniaca. In linea generale è opportuno procedere ad una duplice distillazione, aggiungendo, nel secondo stadio di distillazione, 2 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] e 1 g di persolfato di potassio [$K_2S_2O_8$] per ogni litro di acqua. Con questo procedimento l'acqua preparata di fresco non dovrebbe contenere più di 5 μg L^{-1} di N-NH_3.
Soluzione di fenolo 100 g L^{-1}. Sciogliere 10 g di fenolo [C_6H_5OH] in 100 mL di alcool etilico al 95%. La soluzione conservata in bottiglia scura e in frigorifero è stabile per 24 ore.

Soluzione di nitroprussiato di sodio 5 g L^{-1}. Sciogliere 0,5 g di pentacianonitrosilferrato(III) di sodio diidrato [$Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$] alcalinizzato con qualche goccia di NaOH al 10% in 100 mL di acqua. La soluzione va conservata in bottiglia di vetro scuro e deve essere preparata giornalmente.

Soluzione di ipoclorito di sodio al 5% (m/v) di cloro attivo. Diluire opportunamente con acqua una soluzione a titolo noto di ipoclorito di sodio [NaClO] concentrato. La soluzione si decompone lentamente e va conservata in bottiglia scura; il suo titolo va controllato spesso.

Soluzione di citrato di sodio 200 g L^{-1}. Sciogliere 100 g di citrato trisodico diidrato [$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$] e 5 g di idrossido di sodio [NaOH] e diluire a 500 mL con acqua; questa soluzione va conservata in bottiglie di polietilene.

Soluzione ossidante. Mescolare 100 mL di soluzione di citrato di sodio e 25 mL di soluzione di ipoclorito di sodio. La soluzione va preparata al momento dell'uso.

Soluzione di idrossido di sodio 0,1 M. Sciogliere in acqua 4 g di idrossido di sodio [NaOH] e diluire a 1.000 mL con acqua.

Soluzione di acido solforico 0,05 M. Versare, lentamente e raffreddando, 2,8 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1.84) in circa 500 mL di acqua e diluire a 1.000 mL.

Soluzione concentrata di azoto ammoniacale (1 mL ≈ 0,4 mg di N-NH_3). Sciogliere 1,483 g di cloruro di ammonio anidro [NH_4Cl], preventivamente essiccato a 100°C e portato a peso costante, in acqua bidistillata e portare il volume a 1.000 mL.

Soluzione diluita di azoto ammoniacale (1 mL ≈ 0,004 mg di N-NH_3). Diluire 10 ml di soluzione concentrata di azoto ammoniacale in acqua bidistillata e portare il volume della soluzione a 1.000 mL.

1.5. Procedimento

1.5.1. Titolo della soluzione di ipoclorito di sodio

Prelevare 1 mL di soluzione di ipoclorito di sodio in una beuta da 250 mL; aggiungere 40÷50 mL di una soluzione alcalina a titolo noto di triossido di diarsenico [As_2O_3] 0,1 N **(veleno)**; agitare; aggiungere acido solforico 0,05 M fino a che la soluzione è debolmente acida al tornasole blu; aggiungere cautamente 50 mL di una soluzione al 3% (m/v) di bicarbonato di sodio [$NaHCO_3$] e 2 mL di una soluzione di salda d'amido come indicatore.

Titolare l'eccesso di arsenico(III) con una soluzione a titolo noto di iodio 0,1 N fino alla prima comparsa di un colore azzurro pallido.

Se si è prelevato 1 mL della soluzione di ipoclorito, la percentuale di cloro attivo è:

$$Cl\% = (V_{AS} - V_I) \cdot 0,3545$$

dove:

V_{AS} = volume in mL di soluzione di arsenico 0,1N;
V_I = volume in mL di soluzione di iodio 0,1N.

1.5.2. Taratura

Prelevare dalla soluzione di azoto ammoniacale diluita volumi variabili da 0 a 10 mL corrispondenti a 0 (bianco); 0,004;……..; 0,04 mg L^{-1} di N-NH_3 e introdurre in cilindri graduati da 100 mL muniti di tappo smerigliato; diluire a 50 mL ed aggiungere, agitando dopo ogni aggiunta, 2 mL della soluzione di fenolo, 2 mL della soluzione di nitroprussiato e 5 mL della soluzione ossidante.

Per un corretto sviluppo del colore il pH della soluzione finale deve essere compreso tra 10,3 e 10,8; se ciò non si verifica, la "soluzione di citrato" deve essere modificata opportunamente.

Lasciare ciascun campione a riposo per 1 ora a 20÷22°C e misurare allo spettrofotometro o al colorimetro le assorbanze delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 635 nm usando celle da 1 cm di cammino ottico. Tracciare il grafico di calibrazione ponendo in ascissa i mg di N-NH_3, presenti nei 59 mL sottoposti a misura e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del bianco dei reattivi.

1.5.3. Dosaggio
Se necessario neutralizzare un volume "noto" del campione con volumi "noti" di NaOH 0,1M o H_2SO_4 0,05M.
In un cilindro graduato da 100 mL, munito di tappo smerigliato, introdurre 50 mL di campione neutralizzato, oppure un'aliquota Vc da diluire nel cilindro a 50 mL. Aggiungere, agitando dopo ogni aggiunta, 2 mL della soluzione di fenolo, 2 mL della soluzione di nitroprussiato e 5 mL della soluzione ossidante.
Per un corretto sviluppo del colore il pH della soluzione finale deve essere compreso tra 10,3 e 10,8; se ciò non si verifica, la "soluzione di citrato" deve essere modificata opportunamente.
Lasciare il campione a riposo per 1 ora a 20÷22°C e misurare allo spettrofotometro o al colorimetro l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 635 nm usando celle da 1 cm di cammino ottico.

1.6. Espressione dei risultati
La quantità di azoto ammoniacale presente nel campione è data:

$$N\text{-}NH_3\ (mg\ L^{-1}) = \frac{1000 \cdot a \cdot Vd}{Vc \cdot V}$$

dove:

V	=	volume in mL del campione in esame eventualmente sottoposto a diluizione;
Vd	=	volume in mL cui si è diluito il volume V di campione in esame; se non si è proceduto a diluizioni V = Vd;
Vc	=	volume in mL della soluzione diluita (Vd) del campione in esame prelevato per il dosaggio spettrofotometrico;
a	=	mg di $N\text{-}NH_3$, ricavati dal grafico di taratura, presenti nei 59 mL finali e quindi nel volume Vc.

La quantità di ione ammonio presente nel campione è data:

$$NH_4^+\ (mg\ L^{-1}) = mg\ L^{-1}\ (N\text{-}NH_3) \cdot 1,2879$$

1.7. Precisione ed accuratezza
Il metodo è preciso entro il 7% ed è accurato entro ± 10÷15%. Precisione ed accuratezza maggiori (3%) si hanno in acque non troppo dure e/o non troppo saline e/o poco inquinate, senza "specifiche interferenze".

2. Determinazione potenziometrica

2.1. Principio del metodo
Il metodo si basa sull'impiego dell'elettrodo specifico del tipo a diffusione gassosa per la determinazione dell'ammoniaca in campioni di acqua previamente alcalinizzati. Una membrana permeabile al gas consente il passaggio dell'ammoniaca dalla soluzione in esame alla soluzione interna all'elettrodo; l'entità di tale passaggio dipende dalla concentrazione dell'ammoniaca nella soluzione in esame ed è quantitativamente misurata attraverso una variazione del pH dello strato di elettrolita a più stretto contatto della parete interna della membrana. Il metodo è di facile manualità e rapida esecuzione.

Il metodo può essere applicato alle acque naturali, dolci, salmastre e di mare. La determinazione può anche essere effettuata in soluzioni colorate o torbide. L'intervallo di concentrazione utile è compreso tra 0,5 e 1.000 mg L^{-1} di $N\text{-}NH_3$.

2.2. Interferenze e cause di errore

Metilammina ed etilammina interferiscono fornendo valori in eccesso di ammoniaca ed inoltre per concentrazioni maggiori di 6 e 9 mg L^{-1} rispettivamente, corrispondenti a circa 3 mg L^{-1} di N-NH_3, l'elettrodo non si stabilizza; anche idrazina, cicloesilammina ed ammine alifatiche a 6, 7, 8 atomi di carbonio interferiscono per concentrazioni maggiori di 1 mg L^{-1}. Queste interferenze possono essere eliminate per diluizione. Urea, cloroammina e amminoacidi inferiori, in particolare l'acido amminoacetico e l'acido aspartico, non interferiscono. Tra i tensioattivi, interferiscono soltanto quelli ionici. In particolare i tensioattivi cationici forniscono valori in eccesso se presenti a concentrazione maggiore di 1 mg L^{-1}, mentre gli anionici, se presenti a concentrazione maggiore di 50 mg L^{-1}, provocano lo sfaldamento della membrana, avvertibile da un suo viraggio al colore giallo. Questa interferenza può essere eliminata per distillazione o per diluizione. Fra gli ioni metallici interferisce il mercurio se presente a concentrazione superiore a 0,2 mg L^{-1}. La temperatura deve essere la stessa entro ± 1 °C per le operazioni di standardizzazione e per quelle di misura. Analogamente, ai fini di una maggiore precisione e accuratezza delle misure, è opportuno che anche la forza ionica vari entro limiti modesti, eventualmente con l'impiego di un tampone di forza ionica. Comunque la determinazione non viene pregiudicata dalla impossibilità di operare secondo questo accorgimento. Discorso analogo può farsi per la pressione osmotica, per la quale, se possibile, deve evitarsi una differenza troppo marcata di valori per le due soluzioni a contatto con le due facce della membrana. Particolare attenzione infine deve essere posta nell'assicurarsi dell'integrità della membrana.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio preventivamente lavata con una soluzione acida di acido cloridrico (1:1) e quindi abbondantemente risciacquata in acqua bidistillata preparata di recente ed esente da ammoniaca.
- Elettrometro con scala espansa. L'elettrometro deve essere in grado di apprezzare variazioni di ± 0,5 mV e deve essere possibilmente fornito di sistema a compensazione (controcorrente) e di registratore grafico.
- Elettrodo a membrana. Elettrodo a membrana a diffusione gassosa per ammoniaca. L'elettrodo deve essere conservato seguendo rigorosamente le istruzioni della ditta costruttrice. Prima dell'uso l'efficienza dell'elettrodo deve essere verificata eseguendo i seguenti controlli: pendenza (funzione della temperatura), tempo di risposta (funzione della concentrazione di ammoniaca), riproducibilità, intervallo di concentrazione con risposta lineare. Prove eseguite con un elettrodo commerciale di buona qualità conservato in una soluzione 10^{-4} M in cloruro di ammonio e 10^{-1} M in idrossido di sodio, hanno fornito i seguenti risultati:
  - tempo di risposta: per concentrazioni dell'ordine di 1 mg L^{-1} di N-NH_3 il tempo di risposta è dell'ordine dei 20÷30 secondi e comunque non superiore ai 60÷80 secondi;
  - ripetibilità dei dati: intorno al 5%;
  - intervallo di concentrazione in cui il diagramma potenziale dell'elettrodo-logaritmo della concentrazione è lineare: 1÷1000 mg L^{-1}; il limite inferiore può essere abbassato fino a 0,1 mg L^{-1} a condizioni di operare con ambientamento dell'elettrodo in tampone a pH 4 per qualche ora, con grandi volumi di campione (dell'ordine del litro) e tempi più lunghi di stabilizzazione.
  - coefficiente angolare del tratto lineare del suddetto grafico (esso è funzione della temperatura): 57,5 mV per decade di concentrazione a 18°C, 59,5 mV per decade di concentrazione a 25°C.
- Agitatore meccanico, possibilmente ad acqua; in sua mancanza, agitatore elettromagnetico.
- Termostato. Le misure devono essere preferibilmente eseguite in termostato a ±1°C.

2.4. Reattivi

Acqua distillata esente da ammoniaca, ottenuta facendo passare l'acqua distillata attraverso una colonna di scambiatore ionico a letto misto.

Soluzione di idrossido di sodio 10 M. Sciogliere 400 g di idrossido di sodio [NaOH], esente da ammoniaca in 800 mL di acqua, lasciare raffreddare e diluire a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard concentrata di cloruro di ammonio (1 mL = 1 mg N-NH_3). Pesare con l'approssimazione di ±1 mg intorno a 3,819 g di cloruro di ammonio anidro [NH_4Cl] seccato a 110°C, sciogliere in acqua e diluire a 1.000 mL.

Soluzione standard diluita di cloruro di ammonio (1 mL = 0,01 mg N-NH_3). Prelevare 10 mL della soluzione standard concentrata e diluire ad 1.000 mL con acqua. Quando si analizzano campioni di acqua marina, gli standard debbono essere preparati sciogliendo il cloruro di ammonio in acqua di mare sintetica.

Acqua di mare sintetica. Sciogliere in 1.000 mL di acqua i seguenti sali esenti da ammoniaca: NaCl 24,53 g; $MgCl_2$•6 H_2O 11,1 g; Na_2SO_4 4,09 g; $CaCl_2$•2H_2O 1,54 g; KCl 0,69 g; $NaHCO_3$ 0,2 g; KBr 0,1 g; H_3BO_3 0,03 g; $SrCl_2$•6H_2O 0,05 g; NaF 0,003 g.

2.5. Procedimento

Si possono applicare tanto il metodo della retta di taratura che quello delle aggiunte. In ogni caso la soluzione in esame deve essere preliminarmente alcalinizzata a pH ≈ 12.

2.5.1. Metodo della retta di taratura

Preparare soluzioni a concentrazione nota di ammoniaca nell'intervallo 0,5÷1.000 mg L^{-1} utilizzando la soluzione standard concentrata e/o diluita di cloruro di ammonio; aggiungere 1 mL della soluzione di NaOH 10 M e portare a 1.000 mL con acqua; chiudere il beaker contenitore con parafilm: agitare la soluzione energicamente, ma non tanto da provocare vortici; a stabilizzazione raggiunta leggere il potenziale dell'elettrodo a membrana contro un elettrodo di riferimento procedendo dalle soluzioni più diluite a quelle più concentrate. Utilizzare la retta $E = f(\log C_{N\text{-}NH3})$ che viene così determinata, per dosare la concentrazione dell'ammoniaca nel campione in esame, che deve essere trattato esattamente allo stesso modo delle soluzioni impiegate per la taratura.

2.5.2. Metodo delle aggiunte

A 100 mL del campione aggiungere 1 mL della soluzione di NaOH 10 M e 10 mL di soluzione standard a concentrazione C_s, quanto più possibile vicina a dieci volte quella della soluzione incognita, leggendo il potenziale prima e dopo l'aggiunta. Dal valore della differenza di potenziale (ΔE) è possibile ricavare la concentrazione incognita C_x, nota quella dello standard C_s.

2.6. Espressione dei risultati

Dal valore di E e/o ΔE tramite tabelle fornite dalla casa costruttrice dell'elettrodo si risale al valore N-NH_3 mg L^{-1}.

La quantità di ione ammonio presente nel campione è data:

$$NH_4^+ \text{ (mg } L^{-1}) = \text{mg } L^{-1} \text{ (N-}NH_3) \bullet 1,2879$$

2.7 Precisione ed accuratezza

La riproducibilità è dell'ordine di ±4%; l'accuratezza varia tra il 3 ed il 7%, nell'intervallo di concentrazione 1÷100 mg L^{-1} di N-NH_3.

3. Determinazione per distillazione

3.1. Principio del metodo

L'ammoniaca, essendo una base debole facilmente volatile, può essere separata quantitativamente da una soluzione acquosa mediante distillazione ad un pH intorno a 7,4.
Poiché le acque naturali hanno in genere differenti valori di pH e diverse proprietà tamponanti, al fine di mantenere il pH necessario durante il processo di distillazione, viene aggiunta al campione una soluzione tampone di fosfato.
L'ammoniaca può essere determinata per via colorimetrica con reattivo di Nessler, o per titolazione con H_2SO_4 usando come indicatore il rosso di metile.

3.2. Interferenze e cause di errore

Lo ione calcio interferisce nel metodo per distillazione perché reagisce con il fosfato abbassando il pH e se la concentrazione di calcio supera i 250 mg L^{-1} occorre aggiungere un volume maggiore di tampone fosfato. Alcune ammine alifatiche ed aromatiche, cloroammine organiche, acetone, aldeidi, alcool e altri composti organici causano torbidità e producono, per aggiunta del reattivo di Nessler, colorazioni anomale; pur non essendo possibile eliminare tale interferenza, si consiglia di procedere con il metodo per distillazione. Anche l'H_2S può produrre intorbidamento; in tal caso si aggiunge del carbonato di piombo prima della distillazione. Le ammine interferiscono nel metodo per titolazione perché essendo basi reagiscono con il titolante. Alcune sostanze volatili, come la formaldeide, possono essere rimosse mediante ebollizione a basso pH prima di procedere alla distillazione o all'aggiunta del reattivo di Nessler. Qualora si utilizzi il metodo colorimetrico diretto, in presenza di acque torbide o colorate, si aggiunge un flocculante quale l'idrossido di zinco e, se sono rimasti ioni calcio o magnesio in soluzione, occorre stabilizzarli per aggiunta di una soluzione di EDTA per evitare che precipitino dopo aggiunta del reattivo di Nessler.

3.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio preventivamente lavata con una soluzione acida di acido cloridrico (1:1) e quindi abbondantemente risciacquata in acqua bidistillata preparata di recente ed esente da ammoniaca.
- Spettrofotometro o fotometro a filtri per misure tra 400 e 425 nm dotato di celle di cammino ottico da 1 a 5 cm.
- Distillatore comprendente un pallone della capacità di 1.000÷1.500 mL e un refrigerante; tutto costruito in vetro pyrex.

3.4. Reattivi

Tutte le soluzioni devono essere preparate utilizzando prodotti puri e con acqua bidistillata esente da ammoniaca. L'ammoniaca può essere eliminata per distillazione, previa aggiunta di acqua di bromo o acqua di cloro in modo da ottenere un alogeno residuo di 2÷3 mg L^{-1}, o per scambio ionico utilizzando una colonna costituita da una resina scambiatrice di cationi fortemente acida e una scambiatrice di anioni fortemente basica.

Soluzione di tampone fosfato (pH 7,4). Sciogliere 14,3 g di fosfato monopotassico anidro [KH_2PO_4] e 68,8 g di fosfato bipotassico anidro [K_2HPO_4] e portare a 1.000 mL con acqua bidistillata.

Soluzione di acido borico. Sciogliere 20 g di acido borico anidro [H_3BO_3] in acqua bidistillata e diluire ad 1.000 mL.

Soluzione standard concentrata di cloruro di ammonio (1 mL = 1 mg di NH_4^+). Sciogliere 2,9655 g di cloruro di ammonio anidro [NH_4Cl] seccato in stufa a 100 °C, e portare ad 1.000 mL con acqua bidistillata.

Soluzione standard diluita di cloruro di ammonio (1 mL = 0,01 mg di NH_4^+). Prelevare 10 ml di soluzione concentrata di cloruro di ammonio e diluire a 1.000 mL con acqua bidistillata.

Acido solforico 1 N. Aggiungere con cautela 28 mL di H_2SO_4 concentrato (d = 1,84) a 500 mL di acqua bidistillata quindi portare il volume a 1.000 mL.

Acido solforico 0,02 N. Preparare una soluzione standard di acido solforico 0,02 N per diluizione della soluzione 1 N con acqua bidistillata, determinare quindi il titolo esatto.

Indicatore rosso di metile. Sciogliere 0,1 g di rosso di metile e diluire a 100 mL con acqua bidistillata.

Idrossido di sodio 1 N. Sciogliere 40 g di idrossido di sodio [NaOH] in acqua bidistillata e diluire a 1.000 mL.

Tiosolfato di sodio 0,0143 N. Sciogliere 3,5 g di tiosolfato di sodio [$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$] in acqua bidistillata e portare il volume a 1.000 mL.

Solfito di sodio 0,0143 N. Sciogliere 0,9 g di solfito di sodio [Na_2SO_3] in acqua bidistillata e portare il volume a 1.000 mL.

Arsenito di sodio 0,0143 N. Sciogliere 1 g di arsenito di sodio [$NaAsO_2$]in acqua bidistillata e portare il volume a 1.000 mL.

Reattivo di Nessler **(tossico).** Sciogliere 100 g di ioduro mercurico [HgI_2] e 70 g di ioduro di potassio [KI] in una piccola quantità di acqua bidistillata ed aggiungere lentamente e sotto costante agitazione questa miscela ad una soluzione fredda di 500 mL di acqua bidistillata contenente 160 g di NaOH. Portare il volume finale della soluzione a 1.000 mL. Tale reattivo, conservato al buio in recipienti di vetro pyrex, si mantiene stabile per circa un mese. Il reattivo deve comunque considerarsi alterato se, aggiunto a 50 mL di una soluzione contenente 0,1 mg L^{-1} di ammoniaca, non sviluppa la colorazione caratteristica entro 10 minuti o se, entro 2 ore dall'aggiunta, si osserva la formazione di un precipitato.

3.5. Procedimento

3.5.1. Preparazione del distillatore

L'apparecchio di distillazione deve essere privo di tracce di ammoniaca. A tal fine introdurre nel pallone 500 mL di acqua bidistillata e 10 mL di tampone fosfato e lasciare distillare fino a quando il distillato non dia reazione negativa con reattivo di Nessler. L'apparecchio di distillazione deve essere preservato dal contatto con vapori di ammoniaca; proteggere la beuta di raccolta con una trappola di acido solforico.

3.5.2. Preparazione del campione

Introdurre nel distillatore 500 mL del campione da esaminare, o un'aliquota diluita a 500 mL con acqua bidistillata. Qualora il contenuto di ammoniaca fosse inferiore a 0,05 mg L^{-1} oppure se, dopo la determinazione dell'ammoniaca, dovesse essere determinato l'azoto albuminoideo, è opportuno impiegare volumi maggiori di acqua (750÷1.000 mL). Per rimuovere il cloro residuo, eventualmente presente, aggiungere una quantità equivalente di una soluzione ad azione decolorante (tiosolfato di sodio o solfito di sodio o arsenito di sodio). Neutralizzare, se necessario, il campione a pH 7 con acido o con base e quindi aggiungere 10 mL di tampone di fosfato. Dopo questa aggiunta il pH dovrebbe essere 7,4 in caso contrario è possibile aggiungere altri 10 mL di soluzione tampone. Nel caso in cui il contenuto di calcio fosse superiore a 250 mg L^{-1} aggiungere prima 40 mL di soluzione tampone quindi portare il pH a 7,4 con acido o con base.

3.5.3. Distillazione

Introdurre il campione di acqua, tamponato, decolorato e neutralizzato nell'apparecchio di distillazione e lasciare distillare alla velocità di 6÷10 mL minuto^{-1}, fino a reazione negativa del reattivo di Nessler. Lavare infine il refrigerante con una piccolo volume di acqua distillata (5÷10 mL) e unire quest'ultimo al distillato. Quando il contenuto di ammoniaca risulta superiore a 0,05 mg, è necessario raccogliere il distillato in 50 mL di una soluzione di acido borico ed è opportuno aggiungere ulteriori 50 mL di soluzione di acido borico per ogni mg in più di ammoniaca.

3.5.4. Dosaggio
L'ammoniaca può essere dosata sia per via colorimetrica che per via volumetrica.

3.5.4.1. Dosaggio colorimetrico
Aggiungere 1 mL di reattivo di Nessler a 50 mL di distillato o ad un'aliquota diluita a 50 ml con acqua bidistillata esente da ammoniaca. Operare sia per gli standard che per il bianco nelle stesse condizioni di temperatura e tempo di reazione adottate per il campione. Dopo 10 minuti dall'aggiunta del reattivo di Nessler, determinare per via fotometrica o per comparazione visuale l'intensità di colore delle soluzioni. Per campioni con concentrazioni di ammoniaca molto basse la lettura può essere effettuata dopo 30 minuti dall'aggiunta del reattivo.
Misurare l'assorbanza con uno spettrofotometro operante tra 400 e 425 nm, eseguendo le letture contro il bianco dei reattivi. Si costruisce una retta di taratura riportando in un grafico le assorbanze degli standard in funzione delle concentrazioni di ammoniaca presenti. È preferibile costruire una curva di taratura utilizzando standard con concentrazioni di ammoniaca in prossimità del valore presente nel campione.

3.5.4.2. Dosaggio volumetrico
Aggiungere al distillato raccolto in acido borico tre gocce di rosso di metile e titolare con una soluzione a titolo noto di acido solforico 0,02 N fino al viraggio dell'indicatore. Determinare il bianco dei reattivi titolando lo stesso volume di acqua distillata e di acido borico impiegati nel processo di distillazione e apportare le dovute correzioni.

3.6. Espressione dei risultati
3.6.1. Dosaggio colorimetrico
L'ammoniaca totale nel volume originale di campione è data dalla somma dei valori trovati in ciascuna aliquota di distillato. Qualora nel dosaggio colorimetrico venisse utilizzata una porzione rappresentativa del distillato totale, l'ammoniaca può essere calcolata applicando la seguente formula:

$$NH_4^+ \ (mg\ L^{-1}) = \frac{p \cdot B}{C \cdot D} \cdot 1.000$$

dove:

p = mg di NH_4^+ trovati colorimetricamente;
B = mL di distillato totale raccolto, compresi i mL di H_3BO_3;
C = mL di campione originale posto a distillare;
D = mL di distillato impiegato per il dosaggio.

La quantità di azoto ammoniacale è data da:

$$N\text{-}NH_3 \ (mg\ L^{-1}) = mg\ L^{-1}\ (NH_4^+) \cdot 0,78$$

3.6.2. Dosaggio volumetrico
L'ammoniaca presente nel campione può essere calcolata secondo la formula:

$$NH_4^+ \, (mg\ L^{-1}) = \frac{(a-b) \cdot N \cdot 18 \cdot 1.000}{C}$$

dove:

a = mL di H_2SO_4 utilizzati per il campione;
b = mL di H_2SO_4 utilizzati per il bianco;
C = mL di campione originale posti a distillare;
N = normalità dell' H_2SO_4.

La quantità di azoto ammoniacale è data da:

$$N\text{-}NH_3 \, (mg\ L^{-1}) = mg\ L^{-1} \, (NH_4^+) \cdot 0{,}78$$

3.7. Precisione ed accuratezza

Il reattivo di Nessler, preparato di fresco, consente di rilevare 2 μg di ammoniaca in 50 mL di soluzione; tuttavia è difficile avere la riproducibilità dei risultati per concentrazioni inferiori a 6 μg in 50 mL. Con il metodo colorimetrico è possibile raggiungere una precisione di ±5%.
Il dosaggio volumetrico, per concentrazioni di ammoniaca comprese tra 5 e 50 mg L^{-1} è più preciso di quello colorimetrico, con una deviazione standard di ± 0.5 mg L^{-1}.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

AZOTO NITRICO

1. Determinazione colorimetrica

1.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla reazione tra i nitrati e il salicilato di sodio in soluzione acida per acido solforico. Il composto ottenuto ha, in soluzione alcalina, un colore giallo stabile misurabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 420 nm.
Il metodo è applicabile nell'intervallo di concentrazione da 0,5 a 5 mg L^{-1} di azoto nitrico ed è applicabile alle acque naturali e di scarico.

1.2. Interferenze e cause di errore

Se il campione è torbido, ad un'aliquota di campione aggiungere qualche pastiglia di idrossido di sodio per portare il pH a circa 8,5, agitare dopo aver aggiunto 0,5 g di carbone attivo, filtrare ed eseguire sul filtrato il dosaggio dell'azoto nitrico.
Se sono presenti sostanze colorate, a 50 mL di campione aggiungere 1 g di carbone attivo ed agitare energicamente per 5 minuti. Filtrare e sul filtrato eseguire il dosaggio dell'azoto nitrico.
Se è presente sostanza organica a basse concentrazioni (per esempio BOD_5 = 25 mg L^{-1} e COD = 110 mg L^{-1}), i risultati non dipendono dal pretrattamento con carbone attivo.
I cloruri non interferiscono fino ad una concentrazione di 400 mg L^{-1}. Se la concentrazione di cloruri è più alta si ha un'interferenza negativa. In questo caso, dopo aver determinato a parte il contenuto di cloruri nell'acqua in esame, trattare 100 mL di campione con una quantità equivalente di soluzione di solfato di argento; lasciare coagulare il cloruro di argento e, se necessario, favorirne la coagulazione con un leggero riscaldamento. Eliminare il precipitato per filtrazione o centrifugazione ed eseguire il dosaggio dell'azoto nitrico nella fase liquida, tenendo conto della diluizione effettuata.
Il ferro interferisce per concentrazioni superiori a 5 mg L^{-1}; in questo caso agitare una quantità definita di campione con ossido di zinco e filtrare. Sul filtrato limpido eseguire il dosaggio dell'azoto nitrico.
I nitriti interferiscono positivamente per concentrazioni superiori a 2 mg L^{-1}; in questo caso aggiungere al campione prelevato per l'analisi, prima dell'evaporazione a secco, 0,05 g di solfato di ammonio.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro per misure a 420 nm con vaschette da 1 cm di cammino ottico.
- Capsule di porcellana da 60 mL.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. L'acqua indicata nel metodo deve essere distillata o deionizzata.

Soluzione di salicilato di sodio. Sciogliere 0,5 g di salicilato di sodio [2-HOC_6H_4COONa] e portare a 100 mL con acqua. La soluzione va preparata al momento dell'uso.

Soluzione di tartrato di sodio e potassio e di idrossido di sodio. Sciogliere 400 g di NaOH e 60 g di tartrato di sodio e potassio [$NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$], raffreddare e portare a 1.000 mL con acqua. La soluzione va conservata in contenitore di polietilene.

Acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84).

Soluzione di idrossido di sodio 1 N. Sciogliere 40 g di NaOH e portare a 1.000 mL con acqua in matraccio tarato.

Soluzione di idrossido di sodio 0,1 N. Introdurre 10 mL della soluzione di NaOH 1 N in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua.

Solfato di ammonio [$(NH_4)_2SO_4$].

Ossido di zinco [ZnO].

Soluzione di solfato di argento (1 mL = 1 mg di Cl^-). Sciogliere 4,4 g di solfato di argento [Ag_2SO_4] e portare a 1.000 mL con acqua in matraccio tarato.

Carbone attivo.

Soluzione standard concentrata di nitrato di potassio (1 mL = 0,1 mg di N). Sciogliere 0,722 g di nitrato di potassio anidro [KNO_3], aggiungere 1 mL di cloroformio e portare a 1.000 mL con acqua in matraccio tarato.

Soluzione standard diluita di nitrato di potassio (1 mL = 0,005 mg di N). Introdurre 25 mL della soluzione concentrata di nitrato di potassio in matraccio tarato da 500 mL e portare a volume con acqua distillata.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

La taratura va effettuata all'inizio di ogni ciclo di analisi.

Prelevare 0; 1; 2; 5; 10 mL di soluzione standard diluita di azoto nitrico corrispondenti rispettivamente a 0,0; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05 mg di azoto nitrico ed introdurli in capsule di porcellana da 60 mL, portare a volume di 10 mL con acqua, aggiungere 1 mL di soluzione di salicilato di sodio ed evaporare a secco su bagnomaria bollente. Lasciare raffreddare e riprendere il residuo con 2 mL di H_2SO_4 concentrato, inclinando e ruotando la capsula in modo da inumidire completamente il residuo. Lasciare a riposo 10 minuti, aggiungere 15 mL di acqua e poi 15 mL di soluzione di idrossido di sodio e tartrato di sodio e potassio che provoca lo sviluppo della colorazione gialla, stabile almeno 1 ora.

Miscelare bene il tutto con una bacchetta di vetro ed effettuare le letture contro il bianco dei reattivi allo spettrofotometro, utilizzando la lunghezza d'onda di 420 nm con vaschetta da 1 cm di cammino ottico.

Tracciare la retta di taratura ponendo in ascisse le quantità di $N\text{-}NO_3$ in mg ed in ordinate i corrispondenti valori di assorbimento.

1.5.2. Determinazione

Portare il campione di acqua in esame, limpido ed incolore, a pH 7 circa. Introdurre 10 mL, od un volume minore V diluito a 10 mL con acqua, in capsula di porcellana da 60 mL. Alcalinizzare debolmente con una goccia di soluzione di NaOH 0,1 N, aggiungere 1 mL di soluzione di salicilato di sodio ed evaporare a secco su bagnomaria bollente. Lasciare raffreddare e riprendere il residuo con 2 mL di H_2SO_4 concentrato, inclinando e ruotando la capsula in modo da inumidire completamente il residuo. Lasciare a riposo 10 minuti, aggiungere 15 mL di acqua e poi 15 mL di soluzione di idrossido di sodio e tartrato di sodio e potassio che provoca lo sviluppo della colorazione gialla, stabile almeno 1 ora.

Miscelare bene il tutto con una bacchetta di vetro ed effettuare le letture contro il bianco dei reattivi allo spettrofotometro, utilizzando la lunghezza d'onda di 420 nm con vaschetta da 1 cm di cammino ottico.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza rilevato sul campione, utilizzando la retta di taratura, si risale alla concentrazione di $N\text{-}NO_3$ nel campione di acqua in esame secondo la seguente espressione:

$$N\text{-}NO_3\ (mg\ L^{-1}) = \frac{a \cdot 1.000}{V}$$

dove:

a = quantità di azoto nitrico in mg ricavata dalla retta di taratura;

V = volume di campione (in mL) utilizzato per l'analisi.

1.7. Precisione ed accuratezza

Prove effettuate per verificare la precisione del metodo hanno riscontrato una deviazione standard relativa inferiore al 5%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

AZOTO NITROSO

1. Determinazione colorimetrica

1.1. Principio del metodo

A pH 1,5÷2,0 la p-anilinsolfanilammide viene diazotata dall'acido nitroso ed il diazocomposto che ne risulta viene copulato con la N-(l-naftil)-etilendiammina; si ottiene così un azocomposto colorato la cui assorbanza viene misurata a 543 nm.
Eseguendo il dosaggio su 40 mL di acqua da analizzare, il metodo può essere impiegato tra 0,0025 e 0,025 mg L^{-1} di $N\text{-}NO_2$, usando vaschette con un cammino ottico pari a 10 cm e tra 0,025 e 0,250 mg L^{-1} di $N\text{-}NO_2$, usando vaschette con cammino ottico pari a 1 cm. Per concentrazioni di azoto nitroso più elevate si impiega un volume minore di acqua in esame sia come tale che dopo opportuna diluizione.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, di mare e di scarico.

1.2. Interferenze e cause di errore

Il metodo non è influenzato dalla salinità e da variazioni limitate della temperatura (15÷30°C).
Interferiscono, tra le sostanze organiche, il tricloruro di azoto, l'urea e le ammine; tra quelle inorganiche interferiscono: il rame(II) se presente in concentrazione superiore a 0,5 mg L^{-1}, in quanto catalizza la decomposizione del sale di diazonio provocando risultati in difetto; lo ione ioduro se presente in concentrazione superiore a 0,1 mg L^{-1}; ed infine i forti agenti ossidanti e riducenti.
Un'alcalinità dell'acqua maggiore di 600 mg L^{-1} come $CaCO_3$ interferisce perché non consente, con le quantità dei reattivi indicate, di realizzare il pH richiesto. La preventiva neutralizzazione dell'acqua in esame può ovviare a questo inconveniente. Nel caso che l'acqua da analizzare risulti torbida (come tale o lo diviene durante l'analisi, in quanto contiene specie di metalli che al pH di reazione possono formare precipitati in ambiente acido alla concentrazione in cui vengono a trovarsi) e nel caso che sia colorata e assorba alla lunghezza d'onda di misura, si può supplire operando come indicato al punto 1.5.3.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro per il visibile munito di vaschette con cammino ottico da 1-5-10 cm.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua usata deve essere bidistillata o distillata e deionizzata.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,18).

Soluzione di solfanilammide all'1% (m/v). Sciogliere, subito dopo la pesata, 1 g di solfanilammide [$C_6H_8N_2O_2S$] in una soluzione contenente 10 mL di acido cloridrico concentrato e 70 mL di acqua. Diluire a 100 mL con la stessa acqua. Il prodotto solido può alterarsi all'aria e alla luce. La soluzione, conservata in bottiglia scura, è stabile per molti mesi.

Soluzione di naftiletilendiammina allo 0,1% (m/v). Sciogliere 0,1 g di dicloruro di N-(1-naftil)-etilendiammonio [$C_{12}H_{16}Cl_2N_2 \cdot CH_3OH$] in 100 mL di acqua. La soluzione, conservata in bottiglia scura, è stabile per un mese; comunque va rinnovata quando imbrunisce.

Soluzione standard concentrata di $N\text{-}NO_2$ (1 mL ≈ 50 μg di $N\text{-}NO_2$). Pesare con esattezza (±0,0001 g) intorno a 0,2463 g di nitrito di sodio anidro [$NaNO_2$] seccato a 110°C per 1 ora; sciogliere con acqua e diluire esattamente a 1.000 mL con acqua in matraccio tarato. Conservata al buio con l'aggiunta di 1 mL di cloroformio la soluzione è stabile per almeno un mese. Il prodotto solido va con-

servato al riparo dell'aria e dell'umidità perché può ossidarsi. Il suo titolo può essere controllato come descritto al punto 1.5.1.

Soluzione standard diluita di N-NO$_2$ (1 mL ≈ 0,25 µg di N-NO$_2$). Prelevare 5 mL di soluzione standard concentrata e diluire esattamente a 1.000 mL con acqua in matraccio tarato. La soluzione va preparata ogni giorno.

Soluzione standard molto diluita di N-NO$_2$ (1 mL ≈ 0,025 µg di N-NO$_2$). Prelevare 50 mL di soluzione standard diluita e diluire esattamente a 500 mL con acqua in matraccio tarato. La soluzione va preparata ogni giorno.

1.5. Procedimento

1.5.1. Titolo del nitrito di sodio

Sciogliere in acqua una quantità esattamente nota (P), intorno a 0,616 g di $NaNO_2$ e diluire a 500 mL in matraccio tarato. In beute a tappo smerigliato prelevare aliquote da 25 mL della soluzione a titolo noto di permanganato di potassio [$KMnO_4$] 0,05 N, aggiungere 10 mL di acido solforico (1+1) e 25 mL della soluzione di nitrito immergendo la punta della pipetta a doppia tacca o della buretta nella soluzione acida di permanganato. Chiudere la beuta, agitare e scaldare a 70÷80°C. Decolorare la soluzione con 25 mL di soluzione a titolo noto di ossalato di sodio 0,05 N [$Na_2C_2O_8$]. Titolare l'eccesso di ossalato con la soluzione di permanganato 0,05 N fino a lieve colorazione rosa.

L'azoto nitroso (N-NO$_2$) espresso in grammi contenuto in 1 g di $NaNO_2$ si calcola da:

$$\frac{[(V_a+V_d)\cdot N_1-V_c\cdot N_2]\cdot 7{,}004}{2\cdot V_b\cdot P}$$

dove:

P	=	quantità in g di $NaNO_2$;
V_a	=	mL di soluzione a titolo noto di permanganato prelevati;
V_b	=	mL di soluzione di nitrito aggiunti;
V_c	=	mL di soluzione a titolo noto di ossalato di sodio aggiunti;
V_d	=	mL di soluzione di permanganato a titolo noto impiegati nella titolazione;
N_1 e N_2	=	normalità esatte rispettivamente del permanganato e dell'ossalato;
7,004	=	peso equivalente dell'azoto nitroso espresso in grammi.

1.5.2. Taratura

1.5.2.1. Intervallo da 2 a 20 µg L^{-1}

In matracci tarati da 50 mL introdurre volumi di soluzione standard molto diluita variabili da 4 a 40 mL (0,1; ……..; 1 µg N-NO$_2$); aggiungere acqua fino a 40 mL e, agitando dopo ogni aggiunta, 1 mL di soluzione di solfanilammide all'1% e, dopo 2÷3 minuti, 1 mL di soluzione di naftiletilendiammina allo 0,1%. Diluire a 50 mL con acqua e lasciare sviluppare il colore per 10÷15 minuti. Misurare l'assorbanza A_m a 543 nm in vaschette aventi un cammino ottico di 10 cm usando acqua come "bianco". Un campione di acqua, trattato come gli standards e misurato, contro acqua non trattata, dà il "bianco dei reattivi" (BR). Riportare in grafico le assorbanze corrette (A_c) per il "bianco dei reattivi" ($A_c = A_m$ - BR) in funzione dei µg di N-NO$_2$ presenti nei 50 mL della soluzione finale.

1.5.2.2. Intervallo da 20 a 200 µg L^{-1}

Secondo il procedimento di cui al punto precedente misurare, in vaschette da 1 cm di cammino ottico, l'assorbanza di soluzioni standard preparate introducendo nei matracci tarati, volumi da 4 a 40 mL [1; ……..; 10 g N-NO$_2$] di soluzione standard diluita .

1.5.3. Dosaggio del campione

Porre un volume misurato di acqua in esame (da 1 fino a 40 mL a seconda della quantità di azoto nitroso) in un matraccio tarato da 50 mL; aggiungere acqua fino a 40 mL e, agitando dopo ogni aggiunta, 1 mL di soluzione di solfanilammide all'1% e, dopo 2÷3 minuti, 1 mL di soluzione di naftiletilendiammina allo 0,1%. Diluire a 50 mL con acqua e lasciare sviluppare il colore per 10÷15 minuti. Misurare l'assorbanza A_m a 543 nm in vaschette aventi un cammino ottico di 10 cm usando acqua come "bianco": $A_c = A_m - BR$.

Se necessario procedere ad una preliminare filtrazione attraverso filtro da 0,45 µm e ad aggiustamento del pH di un volume noto dell'acqua in esame intorno alla neutralità con volumi noti di soluzioni di acido cloridrico o di idrossido di sodio 1 M.

Se dopo la filtrazione permane una torbidità e/o un colore con un'assorbanza non eccessiva a 543 nm e/o se dopo l'aggiunta dei reattivi si ha una modesta torbidità, si può fare un bianco dell'acqua in esame non trattata (BA) misurando l'assorbanza di un ugual volume di acqua addizionato di 1 mL della soluzione di solfanilammide all'1% e poi diluito a 50 mL. In tal caso $A_c = A_m - (BA+BR)$.

Attraverso il grafico di taratura risalire dall'assorbanza corretta alla quantità in µg di $N\text{-}NO_2$ contenuta nei 50 mL di soluzione finale.

1.6. Espressione dei risultati

La quantità di azoto nitroso ($N\text{-}NO_2$) espressa in mg L^{-1} è data da:

$$N\text{-}NO_2\ (mg\ L^{-1}) = \frac{V_1 \cdot a}{V \cdot V_2}$$

dove:

- a = µg $N\text{-}NO_2$ ricavati dal grafico di taratura, presenti nei 50 mL finali;
- V = volume in mL di acqua in esame non diluita;
- V_1 = volume in mL cui è diluito il volume V di acqua in esame;
- V_2 = volume in mL di soluzione diluita dell'acqua in esame prelevato per il dosaggio spettrofotometrico. Se non sono state effettuate diluizioni $V_1 = V_2$

1.7. Precisione ed accuratezza

La precisione, calcolata come deviazione standard relativa percentuale delle singole misure di assorbanza corretta utili per la taratura, varia: da 5 (per 0,1 µg nella soluzione finale) a 0,4 (per 1 µg) con vaschette da 10 cm; da 1,5 (per 1 µg nella soluzione finale) a 0,5 (per 10 µg) con vaschette da 1 cm. L'errore delle quantità di azoto nitroso, ricavate dalle suddette singole misure di assorbanza mediante il grafico di taratura, è mediamente compreso entro 0,005 µg nell'intervallo 0,1÷1 µg e varia da 0,015 a 0,15 µg nell'intervallo 1÷10 µg nella soluzione finale sottoposta alla misura.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

AZOTO ORGANICO

1. Determinazione volumetrica

1.1. Principio del metodo

Per azoto organico s'intende tutto l'azoto legato mediante gruppi differenti (amminico, imminico, ecc.), incluso l'azoto albuminoideo.
L'azoto organico viene determinato con il metodo di Kjeldahl che si basa sulla trasformazione dell'azoto organico in solfato monoidrogeno d'ammonio mediante mineralizzazione, sulla distillazione dalla soluzione alcalina dell'ammoniaca raccolta in una soluzione di acido borico. Il borato di ammonio viene titolato con una soluzione standard di acido solforico.
Il metodo è applicabile nell'intervallo $1 \div 100$ mg L^{-1}.

1.2. Interferenze e cause di errore

Tale procedura non determina l'azoto proveniente da azidi, azine, azocomposti, idrazoni, ossime, semicarbazoni, nitrati, nitriti, nitrili, nitro- e nitroso composti.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Apparecchio di digestione e distillazione.

1.4. Reattivi

Tutte le soluzioni devono essere preparate utilizzando prodotti puri e con acqua bidistillata esente da ammoniaca. L'ammoniaca può essere eliminata per distillazione, previa aggiunta di acqua di bromo o acqua di cloro in modo da ottenere un alogeno residuo di $2 \div 3$ mg L^{-1}, o per scambio ionico utilizzando una colonna costituita da una resina scambiatrice di cationi fortemente acida e una scambiatrice di anioni fortemente basica.

Soluzione di tampone fosfato 6,5 M. Sciogliere 14,3 g di fosfato bipotassico anidro [K_2HPO_4] e 68,8 g di fosfato monopotassico anidro [KH_2PO_4] e portare a 1.000 mL con acqua bidistillata.

Soluzione di solfato mercurico. Sciogliere 8 g di ossido di mercurio rosso [HgO] in 50 mL di H_2SO_4 1:5 e diluire a 100 mL con acqua distillata.

Soluzione di acido solforico-solfato mercurico-solfato di potassio. Sciogliere 133 g di solfato di potassio [K_2SO_4] in 600 mL di acqua distillata; aggiungere 200 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84) e 25 mL della soluzione di solfato mercurico diluendo poi a 1.000 mL. La soluzione cristalizza a 14 °C.

Soluzione di idrossido di sodio (0,0125 M). Sciogliere 500 g di idrossido di sodio [NaOH] in acqua distillata e diluire a 1.000 mL.

Indicatore alla fenolfaleina. Sciogliere 0,5 g di fenolftaleina (sale bisodico) in 50 mL di alcool etilico al 95%, aggiungere 50 mL di acqua bidistillata. Dopo solubilizzazione aggiungere alcune gocce di NaOH fino a debole colorazione rosa.

Indicatore misto. Mescolare 2 volumi di una soluzione allo 0.2% di rosso di metile in alcool etilico al 95% e 1 volume di soluzione allo 0.25% di blu di metilene in alcool etilico al 95%. La soluzione è stabile per 30 giorni.

Soluzione di acido borico con indicatore. Sciogliere 29 g di acido borico anidro [H_3BO_3] in acqua bidistillata, aggiungere 10 mL di soluzione di indicatore misto e diluire a 1.000 mL. Questa soluzione è stabile per circa 30 giorni.

Soluzione standard di acido solforico 0,2 N (1 mL = 0,28 mg di N). Diluire 0,55 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84) con acqua distillata. Controllare il titolo esatto di tale soluzione usando Na_2CO_3 e l'indicatore misto. Possono essere utilizzate soluzioni di acido con titolo diverso.

Reattivo di Nessler **(tossico).** Sciogliere 100 g di ioduro mercurico [HgI_2] e 70 g di ioduro di potassio [KI] in una piccola quantità di acqua bidistillata ed aggiungere lentamente e sotto costante agitazione questa miscela ad una soluzione fredda di 500 ml di acqua bidistillata contenente 160 g di NaOH. Portare il volume finale della soluzione a 1.000 mL. Tale reattivo, conservato al buio in recipienti di vetro pyrex, si mantiene stabile per circa un mese. Il reattivo deve comunque considerarsi alterato se, aggiunto a 50 mL di una soluzione contenente 0,1 mg L^{-1} di ammoniaca, non sviluppa la colorazione caratteristica entro 10 minuti o se, entro 2 ore dall'aggiunta, si osserva la formazione di un precipitato.

1.5. Procedimento

1.5.1. Digestione

Introdurre in un pallone di Kjeldahl un volume noto di acqua (variabile da 250 mL, se il contenuto di azoto è minore di 10 mg L^{-1}, fino a 25 mL per concentrazioni comprese da 50 a 100 mg L^{-1}). Diluire il campione a 300 mL con acqua bidistillata esente da ammoniaca e, se necessario, portare il pH a neutralità. Aggiungere 25 mL di tampone fosfato, 50 mL di reattivo acido solforico-solfato mercurico-solfato di potassio. Aggiungere altri 50 mL di quest'ultimo reattivo, nel caso in cui fossero presenti grandi quantità di sostanze organiche non azotate, per ogni grammo di sostanza solida contenuta nel campione. Lasciar bollire fino a che la soluzione non si schiarisce e quindi far bollire per altri 20 minuti.

1.5.2. Distillazione

Lasciare raffreddare la soluzione 1.5.1. ed aggiungere 300 mL di acqua. Portare la soluzione a pH alcalino con idrossido di sodio 0,0125 M fino a viraggio della fenolftaleina.

Distillare fino a che il distillato non dia più reazione positiva con il reattivo di Nessler, raccogliendo il distillato in 50 mL di soluzione di acido borico contenente l'indicatore misto. Durante la distillazione l'estremità inferiore del refrigerante deve essere immersa nella soluzione di acido borico e la temperatura nel refrigerante non deve superare i 29 °C.

1.5.3. Dosaggio

L'ammoniaca distillata viene determinata col metodo di Nessler o per titolazione usando la soluzione standard di acido solforico 0,02 N impiegando l'indicatore misto. Effettuare il bianco dei reattivi utilizzati e correggere i risultati per questo valore.

1.6. Espressione dei risultati

Il contenuto di azoto utilizzando la determinazione volumetrica si ottiene dalla formula:

$$\text{N-organico (mg L}^{-1}) = \frac{(a-b) \bullet N}{V} \bullet 14 \bullet 1.000$$

dove:

a	=	mL di acido solforico ~ 0,02 N usati nella titolazione del campione;
b	=	mL di acido solforico ~ 0,02 N usati nella titolazione dei reattivi;
N	=	normalita dell'acido solforico titolante;
V	=	mL di campione prelevati;
14	=	peso equivalente dell'azoto.

1.7. Precisione e accuratezza

Per concentrazioni di azoto da 1 a 5 mg L^{-1} la percentuale media trovata è del 98%. Per concentrazioni di azoto da 5 a 50 mg L^{-1} la percentuale media trovata è del 99%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994). *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

BORO

1. Determinazione colorimetrica

1.1. Principio del metodo

Il boro presente nelle acque reagisce, in ambiente acido, con curcumina dando un composto di colore rosso chiamato rossocianina, che può essere determinato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 555 nm.

Il metodo può essere applicato nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,4 e 4 mg L^{-1} se si prelevano 0,2 mL di campione. Detto intervallo può essere esteso selezionando un appropriato volume di campione o ricorrendo alla diluizione.

Il metodo è applicabile alle acque naturali e di scarico.

1.2. Interferenze e cause di errore

Interferiscono i nitrati se presenti in concentrazione uguale o maggiore di 15 mg L^{-1}, espressa come azoto.

1.3. Apparecchiature

Evitare l'impiego di vetreria al borosilicato. Si raccomanda l'impiego di teflon, polietilene e polipropilene, quarzo, platino, o materiale equivalente.

- Spettrofotometro munito di vaschette di quarzo con cammino ottico da 1 cm adatto per misure a 555 nm.
- Beaker in polietilene da 50 mL.
- Microburetta con divisioni da 0,01 mL.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere distillata e deionizzata.

Soluzione tampone (pH 4,6). Sciogliere 250 g di acetato di ammonio [CH_3COONH_4] in 300 mL di acido acetico glaciale [CH_3COOH] (d = 1,05) e portare a 1.000 mL con acqua. Il pH finale deve risultare 4,6. Conservare il reattivo in flacone di polietilene.

Reattivo acido. Miscelare con precauzione 50 mL di acido acetico glaciale con 50 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84). Conservare il reattivo in flacone di polietilene.

Soluzione di curcumina. Sciogliere 0,125 g di curcumina [$C_{21}H_{20}O_6$] in 100 mL di acido acetico glaciale. Conservare in flacone di polietilene. La soluzione deve essere utilizzata entro 24 ore.

Soluzione standard di boro (1 ml = 0,04 mg di B). Sciogliere 0,2286 g di acido borico anidro [H_3BO_3] in acqua e portare a volume in matraccio tarato da 1.000 mL. Preparare al momento dell'uso e tenere ben chiusa la bottiglia che contiene la soluzione.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

Prelevare esattamente 0 (bianco); 1; 2,5; 5; 10 mL di soluzione standard di boro, introdurli in matracci tarati da 100 mL e portare a volume con acqua. Le soluzioni contengono rispettivamente 0; 0,4; 1; 2; 4 mg L^{-1} di B.

Utilizzando la microburetta prelevare 0,2 mL di ciascuna soluzione, introdurli in beaker di polietilene da 50 mL e aggiungere 3 mL di soluzione di curcumina e 3 mL di soluzione di reattivo acido, mescolare e dopo 45 minuti aggiungere 15 mL di soluzione tampone. Attendere 30 minuti per consentire lo sviluppo del colore e misurare allo spettrofotometro le assorbanze delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 555 nm usando celle con cammino ottico da 1 cm ed effettuando la lettura contro il bianco.

Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa la concentrazione del boro (mg L^{-1}) e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza.

1.5.2. Determinazione

In beaker di polietilene da 50 mL introdurre mediante la microburetta un volume V di campione. Il volume V deve essere tale che il valore di assorbanza ottenuto corrisponda a una concentrazione di boro contenuta nell'intervallo di taratura.

Aggiungere 3 mL di soluzione di curcumina e 3 mL di soluzione di reattivo acido, mescolare e dopo 45 minuti aggiungere 15 mL di soluzione tampone. Attendere 30 minuti per consentire lo sviluppo del colore e misurare allo spettrofotometro l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 555 nm usando celle con cammino ottico da 1 cm ed effettuando la lettura contro il bianco.

1.6. Espressione dei risultati

La concentrazione di boro presente nel campione si ricava dalla seguente formula:

$$\text{Boro (mg L}^{-1}) = \frac{C \cdot 0{,}2 \cdot F}{V}$$

dove:

C = concentrazione di boro (mg L^{-1}) ricavata dal grafico di taratura;
V = volume (in mL) di campione analizzato;
F = fattore di correzione per la diluizione uguale a (21+V)/(21,2).

1.7. Precisione ed accuratezza

La precisione del metodo, espressa come deviazione standard relativa, risulta mediamente inferiore al 10% per tutto l'intervallo di concentrazione 0,4÷4 mg L^{-1} di boro.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*. Quaderno 100 (Roma).

CADMIO

1. Determinazione per assorbimento atomico

1.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso tra il cadmio e il pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) ad un determinato pH. La fase organica, ottenuta per estrazione del complesso con metilisobutilchetone (MIBK), viene aspirata direttamente nella fiamma aria-acetilene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 228,8 nm.
Il metodo consente la determinazione nell'intervallo di concentrazione da 0,001 a 0,02 mg L^{-1}. Concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo opportunamente il campione in esame. Il metodo è applicabile alle acque naturali, di scarico, salmastre e marine.

1.2. Interferenze e cause di errore

La presenza di metalli, come ferro, zinco, nichel, piombo, cobalto, rame, manganese, argento, cromo fino ad un totale complessivo di 30 mg L^{-1}, non impedisce, nelle condizioni descritte nel procedimento, la chelazione e l'estrazione quantitativa del cadmio. Particolare attenzione in questa fase deve essere rivolta al controllo del valore del pH. La presenza di detti elementi complessabili, in concentrazioni superiori al citato limite, può provocare un errore in difetto che viene eliminato aggiungendo ulteriori quantità di APDC.
In ogni caso ciascuno dei singoli metalli, di cui sopra, non deve essere presente, nel campione in esame, a concentrazioni superiori a 10 mg L^{-1}.
La maggior parte delle interferenze dovute a sostanze non complessabili dall'APDC, eventualmente presenti nella matrice, vengono eliminate con l'estrazione.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio; tutta la vetreria impiegata in questa determinazione deve essere lavata con acido nitrico diluito (1+9) caldo e accuratamente risciacquata con acqua. Effettuare questa operazione immediatamente prima di ciascun uso.
- Spettrofotometro ad assorbimento atomico munito di bruciatore per fiamma aria-acetilene e corredato possibilmente di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico e di tutti gli altri indispensabili accessori.
- pH-metro, corredato di una coppia di elettrodi vetro calomelano.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi debbono essere puri per analisi. L'acqua deve essere deionizzata e distillata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Acido cloridrico 0,3 M. Diluire 25 mL di HCl concentrato con acqua e portare a 1.000 mL.
Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).
Acido nitrico diluito (1 + 499). Aggiungere 1 mL di HNO_3 concentrato a 400 mL di acqua e diluire a 500 mL.
Idrossido di sodio [NaOH] 2,5 M. Sciogliere 10 g di NaOH in acqua e diluire a 100 mL.
Soluzione di cloruro di sodio [NaCl] 300 g L^{-1}. Sciogliere 300 g di cloruro di sodio extra puro in 1.000 mL di acqua. Un'aliquota di 200 mL di questa soluzione viene trattata, in imbuto separatore, con 1 mL di HCl 0,3 M, 5 mL di APDC e 20 mL di MIBK. Agitare manualmente per 2 minuti, lasciare decantare per 1 notte alla temperatura di ~ 5°C al riparo della luce, infine scartare la fase chetonica. Questa soluzione di cloruro di sodio può essere conservata a lungo in bottiglia di vetro scuro.

Soluzione di pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC), 10 g L^{-1}. Sciogliere 1 g di pirrolidinditiocarbammato d'ammonio in 100 mL di acqua. Estrarre la soluzione, almeno tre volte, con metilisobutilchetone. Detta soluzione è stabile per una settimana se conservata in bottiglia di vetro scuro. Agitare bene prima dell'uso.

Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare di MIBK con acqua, prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perché il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro.

Soluzione concentrata di cadmio (1 mL = 50 µg Cd). Sciogliere 0,1015 g di cloruro di cadmio idrato [$CdCl_2 \cdot 2,5H_2O$] in 200 mL di acqua e portare a volume di 1.000 mL con acqua. Conservare in bottiglia di polietilene.

Soluzione intermedia di cadmio (1 mL = 0,5 µg Cd). Diluire 10 mL della soluzione concentrata a 1.000 mL con acqua avendo cura di acidificare a pH 3÷4 con HNO_3 diluito oppure con HCl 0,3 M.

Soluzione di lavoro di cadmio (1 mL = 0,1 µg Cd). Immediatamente prima dell'uso, diluire 20 mL della soluzione intermedia di cadmio a 100 mL con acqua. Questa soluzione viene usata per preparare gli standard di taratura durante l'analisi.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

La taratura va eseguita all'inizio di ogni ciclo di analisi.

In una serie di beaker da 400 mL, contenenti ciascuno 1 mL di HNO_3 concentrato introdurre i volumi della soluzione di lavoro di cadmio (0; 10; 20; 30; 40 mL) corrispondenti a (0; 5; 10; 15; 20 µg L^{-1} di Cd); diluire con acqua a 200 mL ed aggiustare il pH a 2,5 con la soluzione di NaOH 2,5 M servendosi del pH-metro.

Travasare quantitativamente le soluzioni in una serie di imbuti separatori, con tappi di teflon, da 300 mL, aggiungere in ciascun imbuto 5 mL di soluzione di APDC, agitare manualmente per 2 minuti e lasciare riposare per 10 minuti. Introdurre successivamente 20 mL di solvente MIBK, agitare vigorosamente per 2 minuti e lasciar separare gli strati.

Raccogliere lo strato organico di ciascuna estrazione in una serie di matracci da 50 mL e tappare.

Effettuare subito le letture allo spettrofotometro ad assorbimento atomico aspirando le soluzioni organiche, secondo la seguente procedura.

Mettere in funzione lo strumento, fissare la lunghezza d'onda a 228,8 nm e regolare l'apertura della fenditura secondo le istruzioni generali; fissare la posizione del bruciatore e regolare i flussi dei gas (aria ed acetilene) seguendo sempre le istruzioni ed accendere la fiamma. Aspirare il solvente MIBK saturo di acqua in modo da condizionare il nebulizzatore e ridurre il flusso di acetilene a valori tali che il segnale ritorni vicino allo zero. Ripetere l'operazione di azzeramento. Effettuare le misure aspirando le soluzioni chetoniche di taratura, registrando i valori di assorbanza letti. Intervallare ogni misura, aspirando solvente MIBK saturo d'acqua, per circa 10÷15 secondi.

Tracciare la curva di taratura, ponendo in ascissa le concentrazioni di cadmio, espresse in µg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del bianco dei reattivi.

1.5.2. Determinazione

1.5.2.1. Cadmio disciolto

Porre in un beaker da 400 mL 200 mL di campione o parte aliquota, filtrati precedentemente attraverso un filtro a membrana da 0,45 µm; aggiustare il pH a 2,5 con la soluzione di NaOH 2,5 M.

Travasare quantitativamente la soluzione in un imbuto separatore, con tappo di teflon, da 300 mL, aggiungere 5 mL di soluzione di APDC, agitare manualmente per 2 minuti e lasciare riposare per 10 minuti. Introdurre successivamente 20 mL di solvente MIBK, agitare vigorosamente per 2 minuti e lasciar separare gli strati.

Raccogliere lo strato organico in un matraccio da 50 mL e tappare.

Effettuare subito la lettura allo spettrofotometro ad assorbimento atomico aspirando la soluzione organica, registrando il valore di assorbanza letto.

1.5.2.2 Cadmio totale

Porre 200 mL o parte aliquota di campione, precedentemente omogeneizzato per agitazione, in un beaker da 400 mL, aggiungere 10 mL di HCl concentrato, 2 mL di HNO_3 concentrato e scaldare su bagno ad acqua oppure su piastra calda fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL per evaporazione moderata.

Raffreddare e filtrare il residuo in un beaker da 400 mL, lavare il beaker contenente il residuo ed il filtro alcune volte e raccogliere nel bicchiere da 400 mL. Diluire con acqua fino a 200 mL ed aggiustare il pH a 2,5 con soluzione di NaOH 2,5 M.

Travasare quantitativamente la soluzione in un imbuto separatore, con tappo di teflon, da 300 mL, aggiungere 5 mL di soluzione di APDC, agitare manualmente per 2 minuti e lasciare riposare per 10 minuti. Introdurre successivamente 20 mL di solvente MIBK, agitare vigorosamente per 2 minuti e lasciar separare gli strati.

Raccogliere lo strato organico in un matraccio da 50 mL e tappare.

Effettuare subito la lettura allo spettrofotometro ad assorbimento atomico aspirando la soluzione organica, registrando il valore di assorbanza letto.

1.5.2.3. Bianco dei reattivi

Nel caso della determinazione del cadmio disciolto, procedere come indicato al punto 1.5.2.1. sostituendo il volume del campione utilizzato con un identico volume di acqua acidificata con HNO_3 concentrato (5 mL HNO_3 per litro di acqua).

Nel caso della determinazione del cadmio totale, procedere come descritto al punto 1.5.2.2. dopo aver provveduto alla sostituzione del volume del campione con un identico volume di acqua, previamente acidificata con HNO_3 concentrato (5 mL HNO_3 per litro di acqua).

Le stesse operazioni verranno effettuate nel caso che si voglia determinare il cadmio in acque salmastre o marine. In questo caso il volume del campione verrà sostituito da un identico volume di soluzione di cloruro di sodio 300 g L^{-1}.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore delle assorbanze (differenza tra l'assorbanza del campione e del corrispondente bianco), tramite la curva di taratura, si risale alla concentrazione del cadmio nel campione, espressa in µg L^{-1}.

1.7. Precisione ed accuratezza

Questo tipo di analisi mostra un recupero compreso tra il 93 e il 100% delle quantità aggiunte e una deviazione standard relativa compresa tra l'1,1 e il 9,3%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

ISO (1976), *Determination of Cadmiun by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry-Chelation (APDC) Extraction (MIBK)*, ISO/TC 147 Water Quality, DP 5961.

CALCIO

1. Determinazione per assorbimento atomico

1.1. Principio del metodo
Il calcio viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 422,7 nm.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, per concentrazioni comprese fra 0,1 e 10 mg L^{-1} di Ca. Concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo opportunamente il campione. Nel caso in cui le concentrazioni da determinare siano notevolmente basse si ricorrerà al metodo delle aggiunte.

1.2. Interferenze e cause di errore
Per acque ad elevata salinità, dopo opportune diluizioni, si ricorrerà al metodo delle aggiunte per evitare interferenze o errori. L'interferenza del fosfato nella determinazione del calcio viene eliminata con l'aggiunta di sali di lantanio.

1.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore per aria-acetilene e di tutti gli accessori necessari.

1.4. Reattivi
Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua distillata e/o deionizzata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Acido cloridrico (1+1). Aggiungere un volume di HCl concentrato ad 1 volume di acqua.
Acido cloridrico (1+99). Aggiungere un volume di HCl concentrato a 99 volumi di acqua.
Soluzione di lantanio (10% La). Sciogliere 117,276 g di ossido di lantanio (La_2O_3) in poca acqua, aggiungere 250 mL di acido cloridrico concentrato e portare a volume di 1.000 mL con acqua.
Soluzione standard di calcio (1 mL = 1 mg di Ca). Sospendere in acqua 2,5 g di $CaCO_3$ (reagente puro), precedentemente essiccato a 180 °C, sciogliere in un minimo di HCl (1+1) e diluire a 1.000 mL con HCl (1+99).

1.5. Procedimento
1.5.1. Taratura
È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio ed alla fine di ogni ciclo di analisi. Preparare quattro soluzioni di taratura tali che la concentrazione di calcio nel campione risulti compresa tra i loro valori. A tale scopo in quattro matracci da 100 mL diluire opportunamente la soluzione standard di calcio, curando di aggiungere 10 mL di soluzione di lantanio e 1 mL di HCl concentrato. Preparare anche un bianco diluendo 10 mL di soluzione di lantanio e 1 mL di HCl concentrato. Aspirare le soluzioni e tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni e in ordinata le assorbanze corrette del valore del bianco.

1.5.2. Determinazione
1.5.2.1. Analisi del campione
A 80 mL di campione (o ad una sua aliquota diluita) aggiungere 1 mL di HCl concentrato, 10 mL di soluzione di lantanio e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare la soluzione e il bianco, effettuare le letture di assorbanza e sottrarre il valore del bianco da quello della soluzione. Riportare il valore di assorbanza sul grafico di taratura e determinare la concentrazione corrispondente.

1.5.2.2. Metodo delle aggiunte

Preparare quattro aliquote di campione (eventualmente diluito) da 80 mL, a tre di esse aggiungere volumi (fino ad un massimo di 9 mL) di soluzione standard tali da ottenere concentrazioni diverse che comprendano nel loro intervallo la concentrazione incognita da determinare e alla quarta aliquota addizionare 9 mL di acido cloridrico 1+99. Aggiungere poi 1 mL di HCl concentrato, 10 mL di soluzione di lantanio e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare le soluzioni ed il bianco, effettuare le letture di assorbanza, quindi sottrarre il valore del bianco da quello delle soluzioni. Riportare in un grafico sull'asse delle ordinate i valori di assorbanza ottenuti e in ascissa i valori di concentrazione delle soluzioni ottenuti dopo le aggiunte standard. La retta passante per i punti così individuati incontra l'asse delle ascisse in un punto (di valore negativo sul grafico) corrispondente alla concentrazione del campione in esame.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurato, la concentrazione di Ca^{++} espressa in mg L^{-1} è data da:

$$Ca^{++}\ (mg\ L^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V}$$

dove:

a	=	concentrazione di calcio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
V	=	volume di campione (in mL) usato.

La concentrazione di Ca^{++} espressa in meq L^{-1} è data da:

$$Ca^{++}\ (meq\ L^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V \cdot 20,04}$$

dove:

a	=	concentrazione di calcio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
V	=	volume di campione (in mL) usato;
20,04	=	peso equivalente del calcio.

1.7. Precisione ed accuratezza

La deviazione standard determinata su un campione avente un valore medio misurato di 61 mg L^{-1} è risultata ± 0,4 mg L^{-1}. Su un campione contenente 6 mg L^{-1} si sono ottenuti recuperi superiori al 98%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).

CARBONATI E BICARBONATI

1. Determinazione potenziometrica

1.1. Principio del metodo

Il contenuto di ione HCO_3^- e $CO_3^=$ nelle acque si determina titolando con un acido il campione in esame. La titolazione con una soluzione standard di acido minerale forte viene effettuata fino ai due successivi punti di equivalenza del bicarbonato e dell'acido carbonico. Questi punti di equivalenza possono essere individuati potenziometricamente.
Se il campione in esame contiene altre specie ioniche a carattere basico, le relazioni impiegate per il calcolo delle concentrazioni di bicarbonati e carbonati non sono di regola applicabili.
Il campione è titolato direttamente aggiungendo volumi noti di soluzione standard di acido e annotando, dopo ogni aggiunta, il valore del pH misurato con un pH-metro.
I due punti di equivalenza possono essere identificati dai due flessi delle curve di titolazione o dai massimi ottenuti diagrammando le curve derivate.
Il diagramma della curva di titolazione tiene conto di qualunque spostamento del punto di equivalenza dovuto alla temperatura, alla forza ionica, ecc.
Il metodo è applicabile alle acque naturali.

1.2. Interferenze e cause di errore

Il metodo potenziometrico non subisce interferenza da parte del cloro residuo, è valido per soluzioni colorate e non è affetto dalle incertezze dovute all'operatore nell'apprezzamento del viraggio dell'indicatore.
Sostanze oleose, saponi, sospensioni solide e altri materiali di rifiuto interferiscono, ma non possono venire rimossi poiché alcuni possono essere responsabili della basicità del campione in esame. Analogamente, la formazione di un precipitato durante la titolazione o la presenza di ioni idrolizzabili, p.e. quelli di acidi organici o inorganici deboli, rendono molto lento il raggiungimento dell'equilibrio e possono portare a risultati errati.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Buretta da 50 mL, al decimo di mL.
- Beaker da 300 mL.
- pH-metro con elettrodo di misura, opportunamente calibrato, ed elettrodo di riferimento.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi usati devono essere puri per analisi, l'acqua usata per la preparazione delle soluzioni deve essere bidistillata, priva di CO_2 e deve avere un pH compreso tra 6,2 e 7,2 a 25°C.
Soluzione standard di acido cloridrico 0,02 N. Aggiungere 1,7 mL di acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19) a 100 mL di acqua distillata e diluire a 1.000 mL. Stabilire il titolo della soluzione con Na_2CO_3 riscaldato a 270 °C per 2 ore per eliminare eventuali tracce di $NaHCO_3$, mediante titolazione potenziometrica. In prossimità del punto di equivalenza far bollire la soluzione per allontanare la CO_2; successivamente raffreddare e continuare la titolazione fino a completamento della curva.

1.5. Procedimento

Lavare accuratamente gli elettrodi del pH metro ed un beaker con acqua distillata; quindi asciugare.

Introdurre nel beaker un volume noto di campione (C). Aggiungere la soluzione titolante (soluzione standard di HCl 0,02 N) da una buretta. Il volume di una singola aggiunta non deve superare 0,5 mL. Dopo ogni aggiunta agitare la soluzione meccanicamente: ad equilibrio raggiunto, leggere ed annotare il pH. Continuare la titolazione fino all'ottenimento dei dati necessari per costruire la curva di titolazione completa.
Tracciare la curva di titolazione riportando i valori di pH letti o i valori calcolati del rapporto $\Delta pH/\Delta V$, in funzione del volume progressivo di titolante aggiunto.

1.6. Espressione dei risultati

Detto A il volume (mL) di HCl standard di normalità N usato per raggiungere il primo punto di equivalenza (primo flesso della curva di titolazione) e B quello totale (incluso il volume A) necessario per il secondo punto di equivalenza (secondo flesso), ricavare i valori di P e T con le seguenti formule:

$$P\ (\text{meq L}^{-1}) = \frac{A \cdot N \cdot 1.000}{C} \qquad \text{I° Punto di equivalenza}$$

$$T\ (\text{meq L}^{-1}) = \frac{B \cdot N \cdot 1.000}{C} \qquad \text{II° Punto di equivalenza}$$

dove:

C = volume (mL) di campione prelevato;
A = volume (mL) di HCl 0,02 N utilizzato per raggiungere il I° punto di equivalenza;
B = volume totale (mL) di HCl 0,02 N utilizzato per raggiungere il II° punto di equivalenza;
N = normalità dell'acido cloridrico.

In assenza di idrossidi deve essere $P \leq 1/2\ T$.

Di conseguenza si ha:

$$HCO_3^-\ (\text{meq L}^{-1}) = T-2P \qquad CO_3^{=}\ (\text{meq L}^{-1}) = 2P$$

Se la curva di titolazione inizia a pH inferiore a 8÷8,3, si avrà un solo flesso intorno a pH 4÷5. Di conseguenza sarà P = 0, cioè sono presenti solo bicarbonati. D'altra parte, se è T = 2P sono presenti solo carbonati.

1.7. Precisione ed accuratezza

Non é possibile dare una valutazione attendibile del grado di precisione di questo metodo per la differente composizione delle acque che possono essere prese in esame.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1971), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* (New York, APHA).

CARBONIO

1. Determinazione con analizzatore IR

1.1. Principio del metodo

Il carbonio può essere presente nelle acque sotto forma di carbonati, bicarbonati o di biossido di carbonio libero (carbonio inorganico), oppure di composti organici sospesi o disciolti (carbonio organico). La somma del carbonio inorganico e di quello organico rappresenta il carbonio totale.

Il metodo permette di impiegare un microcampione di acqua e di eseguire il dosaggio con rapidità e con possibilità d'automazione: la tecnica strumentale più adottata è quella del dosaggio mediante assorbimento di radiazioni IR, che risulta semplice, rapido e preciso. Sono tuttavia utilizzate anche tecniche gas-cromatografiche e conduttimetriche.

Una quantità opportuna del campione viene iniettata, in corrente di ossigeno o di aria purificata, in un tubo riscaldato e riempito di catalizzatore. L'acqua è vaporizzata e il carbonio contenuto nei diversi composti, viene liberato sotto forma di CO_2. Questo viene determinato quantitativamente all'uscita del tubo, immettendolo, dopo condensazione del vapor d'acqua, in un apparecchio che ne consente il dosaggio.

Con il metodo cosi schematizzato si misura tutto il carbonio presente nel campione (carbonio totale).

Se si vuol determinare soltanto il carbonio organico, prima dell'immissione nel tubo di combustione i carbonati e i bicarbonati inorganici vengono decomposti per acidificazione, e il CO_2 risultante viene eliminato in corrente di azoto insieme con il CO_2 eventualmente presente nel campione in equilibrio con i bicarbonati.

Per lo stesso scopo si possono invece impiegare due tubi, che operano a temperature diverse. Uno di essi, riempito di amianto impregnato di catalizzatore, è mantenuto a 950°C: il carbonio contenuto nei diversi composti viene così trasformato in CO_2, il che consente di dosare il carbonio totale.

L'altro, riempito con palline di silice fusa su cui viene fatto aderire acido fosforico, lavora a 150÷175°C, il che consente di liberare il CO_2 dai carbonati e dai bicarbonati senza decomporre le sostanze organiche; viene così dosato il solo carbonio inorganico.

Per differenza si ottiene il carbonio organico senza distinzione dei composti di provenienza; tale carbonio organico è detto quindi spesso *carbonio organico totale* ed è indicato con la sigla TOC *(Total Organic Carbon).*

Il metodo può essere applicato ad acque di scarico, superficiali, potabili e di mare a concentrazioni di carbonio comprese tra 0,5÷4.000 mg L^{-1} in funzione dell'apparecchio usato e dell'aliquota di campione dosata.

1.2. Interferenze e cause di errore

L'eliminazione del carbonio inorganico mediante acidificazione e allontanamento del CO_2 con azoto può provocare perdite di sostanze organiche volatili.

Un'altra perdita può essere dovuta alla presenza di particelle solide, contenenti carbonio, relativamente grandi da non poter passare attraverso l'ago della siringa usata per iniettare il campione nel tubo di combustione.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Miscelatore a sbattimento del liquido.
- Agitatore magnetico.
- Microsiringhe varie per volumi tra 0÷1.000 mL.
- Apparecchio con analizzatore IR non dispersivo, possibilmente a doppio tubo.
- pH-metro, completo di elettrodo indicatore e di riferimento.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi.

Acqua bidistillata esente da CO_2. Tutte le soluzioni e le diluizioni devono essere fatte con questo tipo di acqua. L'acqua va usata appena preparata, evitando al massimo il contatto con l'aria.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1, 19).

Soluzione standard di carbonio (1 mL = 1 mg di C). Sciogliere 5,571 g di ossalato di sodio anidro [$Na_2C_2O_4$], in acqua bidistillata e portare a volume in matraccio tarato da 1.000 mL.

Soluzione standard di carbonio inorganico (1 mL = 1 mg di C). Sciogliere 3,5 g di bicarbonato di sodio [$NaHCO_3$] e 4,418 g di carbonato di sodio [Na_2CO_3] in acqua bidistillata e portare a volume in matraccio tarato da 1.000 mL.

Materiali per il riempimento dei tubi per lo sviluppo di CO_2. Il materiale e le modalità di riempimento devono essere quelli consigliati dalla ditta costruttrice dell'apparecchio analizzatore.

Ossigeno purissimo. Esente da biossido di carbonio e, comunque, purificato prima dell'immissione nell'apparecchio facendolo gorgogliare in trappole contenenti una soluzione di idrossido di sodio.

Azoto purissimo. Esente da biossido di carbonio e, comunque, purificato come descritto per l'ossigeno.

1.5. Procedimento

Le differenze tra le varie apparecchiature disponibili rendono impossibile la codificazione dettagliata di istruzioni adatte ad ogni tipo di strumento; per la messa in opera dell'apparecchio è necessario seguire le indicazioni dei costruttori.

Il volume di campione da iniettare nel tubo di combustione è variabile a seconda della capacità del tubo stesso e della quantità di carbonio da dosare.

Il campione viene iniettato quando l'apparecchio è già stato portato a regime per quello che riguarda il flusso di ossigeno, la temperatura dei tubi di combustione, la parte elettronica, ecc.

1.5.1. Calibrazione

1.5.1.1. Carbonio totale e organico

Costruire un grafico ponendo in ascissa le concentrazioni di carbonio in mg L^{-1} ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard di carbonio e in ordinata le altezze dei picchi in mm (eventualmente corrette del valore del bianco di acqua bidistillata trattata in maniera identica alle soluzioni standard) ottenute iniettando a turno ciascuna soluzione standard nel tubo di combustione a 950°C e registrando l'altezza dei rispettivi picchi di assorbimento IR del CO_2 prodotto.

Le concentrazioni adatte alla calibrazione dipendono dall'apparecchio usato: una buona linearità si ha nel range 5÷500 mg L^{-1}

1.5.1.2 Carbonio inorganico

Preparare una serie di soluzioni standard diluendo opportunamente la soluzione standard di carbonio inorganico.

Iniettare, a turno, ciascuna soluzione standard nel tubo a 150÷175°C e, procedendo analogamente al punto 1.5.1.1., costruire la curva di calibrazione per il carbonio inorganico.

1.5.2. Dosaggio del campione

1.5.2.1. Carbonio totale

Se il campione contiene sostanze oleose in superficie e/o particelle in sospensione, dibattere per 10 minuti nell'apposito miscelatore circa 250 mL del campione stesso in modo da disperdere l'olio e/o le particelle solide, che si riducono anche di grandezza.

Se il campione contiene valori elevati di carbonio, diluire opportunamente con acqua bidistillata. La diluizione è necessaria anche quando l'acqua in esame è ricca di sali, acidi e basi.

Iniettare il campione nel tubo di combustione a 950°C nella stessa quantità usata per la curva di calibrazione e registrare l'altezza del picco ottenuto. Si ottiene così il carbonio totale.

Ripetere l'operazione più volte fino a che tre letture consecutive siano riproducibili entro il ±5%.
Correggere i valori delle altezze dei picchi ottenuti sottraendo il valore di un bianco di acqua bidistillata trattato come il campione.

1.5.2.2. Carbonio inorganico
Se l'apparecchio a disposizione è predisposto con il secondo tubo a temperatura 150÷175°C, introdurre il campione procedendo con le stesse modalità descritte. Si ottiene così il carbonio inorganico.

1.5.2.3. Carbonio organico
Se l'apparecchio a disposizione non ha il secondo tubo a temperatura 150÷175°C, si può eliminare il carbonio inorganico in due differenti maniere, a seconda che siano assenti o presenti sostanze organiche volatili.
In caso di sostanze volatili assenti, aggiungere a 10÷15 mL di campione, posti in un beaker da 30 mL, 2 gocce di acido cloridrico concentrato per portare il pH al di sotto di 2 e far gorgogliare azoto per 10 minuti (evitando di usare tubi di plastica).
Tenendo la soluzione in agitazione con l'agitatore magnetico prelevare con la siringa una certa quantità di liquido, e iniettarla nel tubo mantenuto a 950°C; procedere poi come già descritto. Si ottiene così il solo carbonio organico.
Se sono presenti sostanze organiche volatili procedere all'acidificazione, come sopra descritto, con la differenza che si opera in un recipiente chiuso e di volume noto agitando energicamente con l'agitatore magnetico.
Nella fase vapore saranno presenti CO_2 e sostanze organiche volatili. Ponendo nel recipiente, al di sopra del livello dei liquido, una capsulina contenente calce sodata, tutto il CO_2, viene fissato e quindi eliminato dal liquido e dal vapore.
Prelevando il liquido e il vapore, dosando il CO_2 contenuto in ambedue e sommando i risultati (tenendo in debito conto il volume del vapore), si ottiene il carbonio organico.

1.6. Espressione dei risultati

Nei calcoli qui di seguito esposti va tenuto conto delle eventuali diluizioni eseguite.

1.6.1. Carbonio totale
Il valore medio dell'altezza del picco, corretto del picco dei reattivi, permette di ricavare dalla curva di calibrazione i mg L^{-1} di carbonio totale (CT) nel campione in esame.

1.6.2. Carbonio inorganico
Il valore medio dell'altezza del picco, corretto per il bianco, permette di ricavare dalla curva di calibrazione i mg L^{-1} di carbonio inorganico (CI) nel campione in esame.

1.6.3. Carbonio organico
Disponendo di un apparecchio provvisto di ambedue i tubi, il carbonio organico si ottiene dalla differenza:

$$TOC\ (mg\ L^{-1}) = CT - CI$$

Disponendo di un solo tubo di combustione, il valore medio dell'altezza del picco, corretto per il bianco, permette di ricavare dalla curva di taratura i mg L^{-1} di TOC nel campione in esame.

1.7. Precisione ed accuratezza

La sensibilità e la precisione variano a seconda dell'apparecchiatura usata.
Generalmente la precisione varia dall'1 al 10%, dipendendo anche dalla maggiore o minore quantità di solidi sospesi presenti.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed., (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

CIANURI

1. Determinazione volumetrica

1.1. Principio del metodo

L'acido cianidrico può essere determinato quantitativamente mediante titolazione con nitrato di argento impiegando come indicatore la p-dimetilamminobenzilidenerodanina.
Il metodo è applicabile alle acque di scarico, superficiali e potabili ed è utilizzabile per concentrazioni di cianuri superiori a 1 mg L^{-1}.
L'acidificazione di soluzioni contenenti cianuro produce acido cianidrico [HCN] estremamente tossico.

1.2. Interferenze e cause di errore

Le sostanze ossidanti, rilevabili con una cartina amido-iodurata, potrebbero agire sul composto colorato, ed ossidare il CN^-. Se presenti possono essere rimosse addizionando cautamente un agente riducente quale l'acido ascorbico.
I solfuri, che arrecano disturbo sia in fase di distillazione sia al momento del dosaggio, devono essere rimossi, con l'aggiunta, a pH 10÷11, di carbonato di piombo in polvere finché non si abbia più formazione di precipitato di PbS (evitare un eccesso di reattivo).
Gli acidi grassi, che distillano e rendono difficilmente apprezzabile il punto di viraggio nell'analisi volumetrica, possono essere rimossi per estrazione con un volume di solvente pari al 20% del volume del campione a pH 6÷7; dopo l'estrazione riportare il pH a 12 con soluzione di NaOH.
Alcune sostanze possono provocare colore o torbidità; questa interferenza può essere eliminata con il procedimento di distillazione.
Le aldeidi convertono i cianuri a nitrili nelle condizioni di distillazione; questa interferenza può essere eliminata per aggiunta di nitrato d'argento al campione.
Altre interferenze vengono eliminate durante la fase di distillazione.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Apparecchio di distillazione formato da 1 pallone a 3 vie, 1 imbuto da carico, 1 refrigerante ad acqua, 1 termometro e 2 assorbitori.

1.4. Reattivi

È necessario usare reattivi puri per analisi ed acqua distillata o deionizzata.
Acido ascorbico [$C_6H_8O_6$].
Carbonato di piombo [$PbCO_3$].
Solvente per l'estrazione dei grassi (iso-ottano o n-esano o cloroformio).
Soluzione di idrossido di sodio 1 M. Sciogliere 40 g di [NaOH] in 1.000 mL di acqua.
Soluzione di cloruro di mercurio(II) (68 g L^{-1}). Sciogliere 6,8 g di [$HgCl_2$] in 100 mL di acqua.
Soluzione di cloruro di magnesio (510 g L^{-1}). Sciogliere 51 g di cloruro di magnesio esaidrato [$MgCl_2 \cdot 6H_2O$] in acqua e diluire a 100 mL.
Soluzione di indicatore al metilarancio (0,5 g L^{-1}). Sciogliere 50 mg di metilarancio in polvere in 100 mL di acqua.
Soluzione di acido fosforico [H_3PO_4] all'85%.
Soluzione di indicatore al p-dimetilamminobenzilidenerodanina (0,2 g L^{-1}). Sciogliere 0,02 g di p-dimetilaminobenzilidenerodanina in 100 mL di acetone.
Soluzione di nitrato d'argento 0,01 N (1 mL = 0,26 mg CN). Sciogliere 3,2407 g di nitrato d'argento [$AgNO_3$] seccato a 140°C, in 1.000 mL di acqua. Il titolo di questa soluzione viene determinato con una soluzione standard di cloruro di sodio [NaCl] usando come indicatore bicromato di potassio [K_2CrO_4].

1.5. Procedimento

1.5.1. Solubilizzazione

Per effettuare la solubilizzazione di eventuali cianuri insolubili presenti allo stato di piccole particelle solide sospese nel liquido, il campione, che è stato sottoposto ai trattamenti indicati per eliminare le interferenze, viene portato all'ebollizione per alcuni minuti (normalmente 10 minuti risultano sufficienti) curando che il pH si mantenga sul valore di 11. Raffreddare e filtrare.

1.5.2. Distillazione

Introdurre il liquido, già sottoposto ai pretrattamenti ritenuti necessari, nel pallone da distillazione. tenendo presente che, per concentrazioni di CN^- non superiori a 10 mg L^{-1} occorre distillare un campione di 500 mL, mentre per concentrazioni superiori a 10 mg L^{-1} occorre una quantità proporzionalmente inferiore, diluire in ogni caso a 500 mL con acqua. Predisporre l'apparecchio di distillazione sotto cappa, ponendo in ciascun dei due assorbitori 50 mL di NaOH 1 M, che possono essere diluiti con acqua al fine di assicurare un sufficiente battente liquido. Collegare l'apparecchio ad una pompa da vuoto ad acqua e regolare il flusso dell'aria in modo che il gorgogliamento non sia superiore a 1÷2 bolle al secondo. Aggiungere 20 mL di soluzione di cloruro di mercurio(II) e 10 mL di soluzione di cloruro di magnesio. Miscelare bene, aggiungere alcune gocce di indicatore al metilarancio, lavare l'imbuto di carico con poca acqua e aggiungere a piccole dosi 50 mL di H_3PO_4. Riscaldare il pallone per un'ora evitando, per quanto possibile, che il vapor d'acqua superi metà dell'altezza del refrigerante, mentre si mantiene in funzione il passaggio di una corrente di aria, che ha il compito di trasportare tutto l'acido cianidrico liberato nel recipiente di raccolta. Dopo questo tempo, interrompere il riscaldamento e lasciare raffreddare mantenendo il gorgogliamento di aria per altri 15 minuti; interrompere il flusso di aria e trasferire il contenuto degli assorbitori in un matraccio tarato di volume C a seconda della ipotizzata concentrazione in CN^-. Lavare i tubi e gli assorbitori con acqua che viene aggiunta nello stesso matraccio tarato; portare a volume con acqua.

1.5.3. Titolazione di Liebig modificata

Prelevare un volume B del distillato portato a volume C: aggiungere 0,5 mL di soluzione di p-dimetilamminobenzilidenerodanina e titolare con la soluzione di nitrato di argento finché il colore vira dal giallo al rosa. Eseguire anche una prova in bianco su un identico volume B di acqua contenente la stessa quantità di idrossido di sodio contenuto nella soluzione sottoposta a titolazione.

1.6. Espressione dei risultati

La concentrazione in cianuro del campione in esame, espressa in mg L^{-1} viene calcolata con la seguente formula:

$$CN^-(\text{mg } L^{-1}) = \frac{A \cdot C \cdot 1000 \cdot N \cdot 26}{B \cdot D}$$

dove:

A = mL di nitrato di argento impiegati nella titolazione dopo aver sottratto i mL consumati dal bianco dei reattivi;

B = volume (in mL) di distillato utilizzato per la titolazione;

C = volume totale (in mL) del distillato, raccolto in matraccio e portato con lavaggi a volume;

D = volume (in mL) di campione sottoposto a distillazione;

N = normalità del nitrato di argento;

26 = peso equivalente di CN^- espresso in mg.

1.7. Precisione ed accuratezza
I dati di precisione ed accuratezza non sono attualmente disponibili.

2. Determinazione colorimetrica

2.1. Principio del metodo
Il metodo colorimetrico prevede la reazione tra il cianuro e la cloramina T a pH inferiore a 8; la successiva reazione del cloruro di cianogeno così ottenuto con piridina dà luogo alla formazione dell'aldeide glutaconica, che con il reattivo pirazolone-piridina forma una sostanza colorata in azzurro che presenta un massimo di assorbimento a 620 nm.
Il metodo è applicabile alle acque di scarico, superficiali e potabili ed è utilizzabile per concentrazioni di cianuri superiori a 0,02 mg L^{-1}.
L'acidificazione di soluzioni contenenti cianuro produce acido cianidrico [HCN] estremamente tossico.

2.2. Interferenze e cause di errore
Le sostanze ossidanti, rilevabili con una cartina amido-iodurata, potrebbero agire sul composto colorato, ed ossidare il CN^-. Se presenti possono essere rimosse addizionando cautamente un agente riducente quale l'acido ascorbico.
I solfuri, che arrecano disturbo sia in fase di distillazione sia al momento del dosaggio. devono essere rimossi, con l'aggiunta, a pH 10÷11, di carbonato di piombo in polvere finché non si abbia più formazione di precipitato di PbS (evitare un eccesso di reattivo).
Gli acidi grassi, che distillano e rendono difficilmente apprezzabile il punto di viraggio nell'analisi volumetrica, possono essere rimossi per estrazione con un volume di solvente pari al 20% del volume del campione a pH 6÷7; dopo l'estrazione riportare il pH a 12 con soluzione di NaOH.
Alcune sostanze possono provocare colore o torbidità; questa interferenza può essere eliminata con il procedimento di distillazione.
Le aldeidi convertono i cianuri a nitrili nelle condizioni di distillazione; questa interferenza può essere eliminata per aggiunta di nitrato d'argento al campione.
Altre interferenze vengono eliminate durante la fase di distillazione.

2.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio.
- Apparecchio di distillazione formato da 1 pallone a 3 vie, 1 imbuto da carico, 1 refrigerante ad acqua, 1 termometro e 2 assorbitori.
- Spettrofotometro per misure di assorbanza a 620 nm.

2.4. Reattivi
Acido ascorbico [$C_6H_8O_6$].
Carbonato di piombo [$PbCO_3$].
Solvente per l'estrazione dei grassi (iso-ottano o n-esano o cloroformio)
Soluzione di idrossido di sodio 1 M. Sciogliere 40 g di [NaOH] in 1.000 mL di acqua.
Soluzione di idrossido di sodio 0,2 M. Addizionare a 1 volume di idrossido di sodio 1 M 4 volumi di acqua.
Soluzione di cloruro di mercurio(II) (68 g L^{-1}). Sciogliere 6,8 g di [$HgCl_2$] in 100 mL di acqua.
Soluzione di cloruro di magnesio (510 g L^{-1}). Sciogliere 51 g di cloruro di magnesio esaidrato [$MgCl_2 \cdot 6H_2O$] in acqua e diluire a 100 mL.
Soluzione di indicatore al metilarancio (0,5 g L^{-1}). Sciogliere 50 mg di metilarancio in polvere in 100 mL di acqua.
Soluzione di acido fosforico [H_3PO_4] all'85%.

*Soluzione standard concentrata di cianuro (**estremamente tossica**) (1 mL = 1 mg)*. Sciogliere 2,51 g di cianuro di potassio [KCN] e 2,0 g di idrossido di potassio [KOH] in 1.000 mL di acqua. Controllare il titolo ogni settimana con nitrato di argento a titolo noto (metodo di Liebig modificato).
*Soluzione standard diluita I di cianuro (**estremamente tossica**) (1 ml = 0,01 mg)*. Diluire 10 mL della soluzione concentrata di cianuro a 1.000 mL. La soluzione va preparata giornalmente.
*Soluzione standard diluita II di cianuro (**estremamente tossica**) (1 mL = 0,001 mg)*. Diluire 10 mL della soluzione diluita I di cianuro a 100 mL. La soluzione va preparata giornalmente.
Soluzione di acido acetico (1+4). Aggiungere un volume di acido acetico [CH_3COOH] concentrato a 4 volumi di acqua distillata.
Soluzione tampone di fosfato (pH = 6,86 a 25°C). Sciogliere in acqua 339 mg di didrogeno fosfato di potassio [KH_2PO_4] e 353 mg di idrogeno fosfato disodico [Na_2HPO_4] e diluire a 100 mL.
Soluzione di cloramina (T 10 g L^{-1}). Sciogliere 10 g di cloramina T in 1.000 mL di acqua. La soluzione è stabile per una settimana e va conservata in frigorifero.
Soluzione di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one (5 g L^{-1}). Preparare una soluzione satura (5 g L^{-1}) aggiungendo il pirazolone ad acqua calda (circa 75°C); raffreddare agitando di tanto in tanto.
Reattivo misto piridina-pirazolone. Miscelare 125 mL di soluzione filtrata di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one con la soluzione filtrata ottenuta sciogliendo 0,025 g di bis-pirazolone in 25 mL di piridina. Preparare questo reattivo giornalmente.
Soluzione di idrogeno fosfato disodico. Sciogliere 5 g di [Na_2HPO_4] anidro in 100 mL di acqua.
Butan-1-olo.

2.5. Procedimento

2.5.1. Solubilizzazione

Per effettuare la solubilizzazione di eventuali cianuri insolubili presenti allo stato di piccole particelle solide sospese nel liquido, il campione, che è stato sottoposto ai trattamenti indicati per eliminare le interferenze, viene portato all'ebollizione per alcuni minuti (normalmente 10 minuti risultano sufficienti) curando che il pH si mantenga sul valore di 11. Raffreddare e filtrare.

2.5.2. Distillazione

Introdurre il liquido, già sottoposto ai pretrattamenti ritenuti necessari, nel pallone da distillazione tenendo presente che, per concentrazioni di CN^- non superiori a 10 mg L^{-1} occorre distillare un campione di 500 mL, mentre per concentrazioni superiori a 10 mg L^{-1} occorre una quantità proporzionalmente inferiore, diluire in ogni caso a 500 mL con acqua. Predisporre l'apparecchio di distillazione sotto cappa, ponendo in ciascun dei due assorbitori 50 mL di NaOH 1 M, che possono essere diluiti con acqua al fine di assicurare un sufficiente battente liquido. Collegare l'apparecchio ad una pompa da vuoto ad acqua e regolare il flusso dell'aria in modo che il gorgogliamento non sia superiore a 1÷2 bolle al secondo. Aggiungere 20 mL di soluzione di cloruro di mercurio(II) e 10 mL di soluzione di cloruro di magnesio. Miscelare bene, aggiungere alcune gocce di indicatore al metilarancio, lavare l'imbuto di carico con poca acqua e aggiungere a piccole dosi 50 mL di H_3PO_4. Riscaldare il pallone per un'ora evitando, per quanto possibile, che il vapor d'acqua superi metà dell'altezza del refrigerante, mentre si mantiene in funzione il passaggio di una corrente di aria che ha il compito di trasportare tutto l'acido cianidrico liberato nel recipiente di raccolta. Dopo questo tempo, interrompere il riscaldamento e lasciare raffreddare mantenendo il gorgogliamento di aria per altri 15 minuti; interrompere il flusso di aria e trasferire il contenuto degli assorbitori in un matraccio tarato di volume C a seconda della ipotizzata concentrazione in CN^-. Lavare i tubi e gli assorbitori con acqua che viene aggiunta nello stesso matraccio tarato; portare a volume con acqua.

2.5.3. Taratura

Porre in diversi cilindri graduati a tappo smerigliato da 50 mL rispettivamente 10 mL di almeno quattro soluzioni standard ottenute diluendo la soluzione standard più adatta affinché la misura del campione rientri nell'intervallo fissato dalla curva di taratura e porre in un altro cilindro 10 mL di acqua

(bianco). Aggiungere 5 mL di idrossido di sodio 0,2 M. Trattare tutte le soluzioni contenute nei cilindri con acido acetico fino quasi a neutralità. Aggiungere qualche mL di soluzione tampone e portare a pH 7 con acido acetico. Aggiungere 0,2 mL di soluzione di cloramina T tappare i cilindri, mescolare per rovesciamento due o tre volte; lasciare riposare per 1 o 2 minuti; aggiungere 5 mL di reattivo misto piridina-pirazolone, tappare di nuovo e mescolare per rovesciamento; lasciare sviluppare il colore per 20 minuti, diluire portando a volume di 25 mL con acqua, mescolare e determinare l'assorbanza delle soluzioni a 620 nm contro il bianco. Costruire un grafico di taratura assorbanza/milligrammi di CN^-.

2.5.4. Dosaggio

Prelevare un volume B (di solito 15 mL) del liquido proveniente dalla distillazione (2.5.2.) e porre in un cilindro da 50 mL. Aggiungere 5 mL di idrossido di sodio 0,2 M. Trattare la soluzione contenuta nel cilindro con acido acetico fino quasi a neutralità. Aggiungere qualche mL di soluzione tampone e portare a pH 7 con acido acetico. Aggiungere 0,2 mL di soluzione di cloramina T, tappare il cilindro e mescolare per rovesciamento due o tre volte; lasciare riposare per 1 o 2 minuti; aggiungere 5 mL di reattivo misto piridina-pirazolone, tappare di nuovo e mescolare per rovesciamento; lasciare sviluppare il colore per 20 minuti, diluire portando a volume di 25 mL con acqua, mescolare e determinare l'assorbanza della soluzione a 620 nm contro il bianco.

2.5.5. Dosaggio previa concentrazione del complesso colorato

Operare come al punto 2.5.4. fino al termine dei 20 minuti di sviluppo del colore. A questo punto aggiungere 1 mL di soluzione di Na_2HPO_4. Misurare esattamente 10 mL di butan-1-olo che vengono aggiunti al cilindro. Tappare e mescolare per rovesciamento. Se le due fasi non si separano entro 3 minuti aggiungere altra soluzione di Na_2HPO_4 e mescolare ancora. Prelevare una parte della fase organica e misurare l'assorbanza a 620 nm contro un bianco ottenuto per estrazione del bianco dei reattivi.

2.6. Espressione dei risultati

La concentrazione in cianuro del campione in esame espressa in mg L^{-1} viene calcolata con la seguente formula:

$$CN^- (mg\ L^{-1}) = \frac{A \cdot C \cdot 1000}{B \cdot D}$$

dove:

A = mg di CN^- letti sulla curva di taratura;
B = volume (in mL) di distillato utilizzato per il dosaggio colorimetrico;
C = volume totale (in mL) del distillato, raccolto in matraccio e portato con lavaggi a volume;
D = volume (in mL) di campione sottoposto a distillazione.

2.7. Precisione ed accuratezza

La precisione del metodo colorimetrico varia notevolmente al variare della concentrazione del cianuro. Per valori compresi fra 1 e 10 mg di CN^- per litro gli scarti possono raggiungere ±25%.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

CLORURI

1. Determinazione argentometrica con indicatore

1.1. Principio del metodo

Titolazione degli ioni cloruro con una soluzione di nitrato di argento in ambiente neutro o leggermente basico, in presenza di cromato di potassio come indicatore: dopo la precipitazione quantitativa del cloruro d'argento si ha colorazione rosso mattone, persistente, del cromato d'argento.
Questo metodo consente il dosaggio dei cloruri in acque relativamente limpide, non troppo colorate e che non contengano una quantità troppo elevata di cationi che possano dare origine, al pH di lavoro, ad interferenze con lo ione cromato e/o lo ione Ag.

1.2. Interferenze e cause d'errore

Possono interferire specie complessanti o precipitanti l'argento.
Interferiscono lo ione bromuro, ioduro, cianuro, tiocianato e arseniato che vengono calcolati come cloruri; ioduri e tiocianati falsano anche il punto di viraggio per fenomeni di adsorbimento.
L'interferenza dei solfuri, tiosolfati e solfiti può essere rimossa aggiungendo, all'ebollizione, una soluzione di perossido d'idrogeno al 30%. Gli ortofosfati interferiscono se presenti in concentrazione superiore a 250 mg L^{-1}, poiché precipitano come fosfato d'argento.
Il ferro(III), in concentrazione superiore a 10 mg L^{-1}, maschera il punto finale della titolazione.
A seconda della quantità, i cationi piombo e bario precipitano con il cromato, i cationi idrolizzabili (alluminio, ferro, bismuto, stagno, zinco ecc.) possono precipitare al pH della titolazione, i cationi colorati (rame, nichel, cobalto) disturbano l'apprezzamento del viraggio.
L'eventuale colorazione o torbidità del campione può essere eliminata mediante preliminare trattamento con una sospensione di idrossido di alluminio e/o carbone attivo.

1.3. Apparecchiature

Normale attrezzatura di laboratorio e buretta graduata di volume adeguato.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua bidistillata e/o deionizzata e distillata.

Soluzione standard di cloruro di potassio 0,1 N. Pesare 7,45 g di cloruro di potassio [KCl], previamente essiccato fino a peso costante in stufa a 180°C e raffreddato in essiccatore. Sciogliere in poca acqua e travasare quantitativamente la soluzione in un matraccio tarato da 1.000 mL. Portare a volume con acqua avendo cura di ben omogeneizzare la soluzione. Calcolare la normalità N_1 in base al rapporto:

$$N_1 = \frac{P}{74,552}$$

dove P è la quantità esattamente pesata al mg di cloruro di potassio. Si consiglia di rinnovare la soluzione ogni mese.

Soluzione standard di nitrato d'argento 0,1 N. Sciogliere circa 17 g di nitrato d'argento [$AgNO_3$] in acqua e trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 1.000 mL. Portare a volume con acqua, avendo cura di ben omogeneizzare la soluzione. Controllare l'esatta concentrazione di questa soluzione, anche se si sono impiegate fiale certificate pronte per la diluizione, titolando con la stessa 20 mL della soluzione standard di cloruro di potassio 0,1 N. Effettuare tale controllo almeno in doppio e lo scarto tra le due prove non deve superare 0,2 mL.

Effettuare il calcolo dell'esatta normalità della soluzione nel modo seguente:

$$N = \frac{N_1 \cdot 20}{n}$$

dove N_1 è la normalità della soluzione di cloruro di potassio, ed n il numero di mL della soluzione di $AgNO_3$, impiegati nella titolazione e corretti del bianco. La soluzione deve essere conservata in recipiente di vetro scuro.

Soluzione di cromato di potassio. Sciogliere 50 g di cromato di potassio [K_2CrO_4] in poca acqua, aggiungere nitrato di argento fino ad incipiente formazione di precipitato rosso. Lasciare sedimentare per circa 12 ore, filtrare e portare il filtrato a 1.000 mL con acqua.

Soluzione di fenolftaleina. Sciogliere 50 g di fenolftaleina in 500 mL di etanolo al 95% e portare a 1.000 mL con acqua. Aggiungere, goccia a goccia, una soluzione di idrossido di sodio 0,01 M, fino alla comparsa di un colore rosa pallido.

Soluzione di perossido di idrogeno al 30%.

Soluzione di acido solforico 0,5 M. Aggiungere molto lentamente e sotto raffreddamento 28 mL di acido solforico [H_2SO_4] (d = 1,84) a 500 mL di acqua. Dopo raffreddamento diluire a 1.000 mL con acqua.

Soluzione di idrossido di sodio 1 M. Sciogliere 40 g di idrossido di sodio [NaOH] in acqua e diluire ad 1.000 mL.

Sospensione di idrossido di alluminio. Sciogliere 125 g di allume potassico [$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$] in 1.000 mL di acqua. Scaldare a 60°C e aggiungere 55 mL di soluzione acquosa concentrata di ammoniaca, lentamente e agitando. Lasciare a riposo per circa 1 ora, quindi travasare la sospensione in una bottiglia e lavare ripetutamente il precipitato con acqua per decantazione, fino a che le acque di lavaggio siano esenti da cloruri.

Carbone attivo.

1..5. Procedimento

1.5.1. Pretrattamento

La soluzione da titolare deve essere limpida, incolore e priva di sostanze interferenti.

Portare 100 mL di campione (o un'aliquota misurata), decantato, a pH 8,3 con NaOH 1 M o H_2SO_4 0,5 M in presenza di fenolftaleina. Se necessario filtrare attraverso una membrana filtrante da 0,45 μm. Lavare il precipitato più volte con 2÷5 mL di acqua. Sul filtrato determinare i cloruri.

Se sono presenti sostanze riducenti, quali solfiti, solfuri, tiosolfati, ecc., portare 100 mL di campione (o aliquota) a pH 8,3 in presenza di fenolftaleina, eventualmente filtrare e lavare il precipitato. Aggiungere 1 o più mL di soluzione di perossido di idrogeno, portare ad ebollizione per pochi minuti e verificare il pH alla fenolftaleina. Se si forma un precipitato filtrare, lavare e sul filtrato determinare i cloruri.

Se il campione, dopo correzione del pH e dopo filtrazione su membrana, rimane torbido e/o colorato, aggiungere a 100 mL di campione (o aliquota), portati a pH 8,3, 3 mL di sospensione di idrossido di alluminio. Agitare, lasciare decantare, lavare il precipitato e sul filtrato determinare i cloruri.

Se il campione pretrattato (o aliquota) da sottoporre alla titolazione è ancora colorato, aggiungere 5 g di carbone attivo, filtrare, lavare e sul filtrato determinare i cloruri.

1.5.2. Titolazione

Prelevare 100 mL esatti di campione, oppure un volume inferiore esattamente noto, che viene diluito a 100 mL a seconda del contenuto di ione cloruro: in genere si preleva una quantità tale che il contenuto di cloruro non superi 70 mg.

Verificare che il campione si trovi intorno a pH 8,0. Se così non fosse, aggiustare il valore mediante acido solforico 0,5 M o idrossido di sodio 1 M.

Aggiungere 1 mL di soluzione di cromato di potassio e titolare con la soluzione standard di nitrato d'argento 0,1 N, fino a viraggio rosso persistente.
È indispensabile eseguire, nelle stesse condizioni, una prova in bianco su un'aliquota di 100 mL di acqua, trattata in modo analogo al campione.

1.6. Espressione dei risultati
La concentrazione degli ioni cloruro nel campione è data dalla formula:

$$Cl^- (meq\ L^{-1}) = \frac{(a-b) \cdot N}{C} \cdot 1.000$$

dove:

a = volume, in mL, di soluzione standard di $AgNO_3$ consumata per la titolazione del campione;
b = volume. in mL, di soluzione standard di $AgNO_3$, consumata per la titolazione del bianco;
N = la normalità della soluzione standard di $AgNO_3$;
C = il volume, in mL, del campione d'acqua prelevato.

Per avere la concentrazione in mg L^{-1}:

$$Cl^- (mg\ L^{-1}) = Cl^- (meq\ L^{-1}) \cdot 35,45$$

1.7. Precisione ed accuratezza
La difficoltà di apprezzare il punto di viraggio limita la precisione del metodo che è dell'ordine di 0,1 mL, pari a 0,35 mg di Cl^-.

2. Determinazione argentometrica per via potenziometrica

2.1. Principio del metodo
Il metodo descritto consente la determinazione in ambiente acido per acido nitrico, in modo molto accurato anche per piccole quantità di cloruri. Il metodo è applicabile a soluzioni colorate e/o torbide e non ha molte interferenze se non si tratta di sistemi fortemente ossidanti o fortemente riducenti o complessanti o che precipitano Ag^+ in ambiente acido.
Il metodo si basa sulla titolazione potenziometrica dello ione cloruro con una soluzione titolata di nitrato d'argento in ambiente acido. La variazione del potenziale è seguita con la coppia, elettrodo d'argento (elettrodo indicatore) ed elettrodo a calomelano saturo (elettrodo di riferimento).

2.2. Interferenze e cause di errore
Il metodo consente, in certe condizioni, di dosare simultaneamente e separatamente gli ioni bromuro e ioduro.
Si può ovviare all'interferenza dovuta ad altri ioni, quali cianuro, solfuro, tiocianato, solfito, ammonio e ferro(III), come descritto al punto 1.5.1.
La presenza di sostanze fortemente ossidanti può nuocere al funzionamento dell'elettrodo indicatore, in quanto può dar luogo alla formazione di depositi di un prodotto di ossidazione dell'argento sull'elettrodo stesso.

2.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio e buretta graduata di volume opportuno.
- Potenziometro, sensibilità 2 mV (potenziale da -500 mV a + 500mV).

- Elettrodo d'argento. L'elettrodo deve essere pulito con carta da filtro, acido nitrico 1 M e acqua distillata prima di ogni titolazione.
- Elettrodo a calomelano saturo.
- Ponte salino. Il ponte è costituito da agar-agar saturo di nitrato di potassio, oppure da soluzione satura di nitrato di potassio, collegata con l'elettrodo a calomelano. È munito alle sue estremità di diaframmi porosi.
- Agitatore elettromagnetico, con barretta rivestita di teflon.

2.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua bidistillata e/o deionizzata e distillata.

Soluzione standard di nitrato d'argento 0,1 N. Sciogliere circa 17 g di nitrato d'argento [$AgNO_3$] in acqua e trasferire quantitativamente in un matraccio tarato da 1.000 mL. Portare a volume con acqua, avendo cura di ben omogeneizzare la soluzione. Controllare l'esatta concentrazione di questa soluzione, anche se si sono impiegate fiale certificate pronte per la diluizione, effettuando la titolazione potenziometrica della soluzione standard di cloruro di potassio 0,1 N.

Soluzione standard di cloruro di potassio 0,1 N. Pesare 7,45 g di cloruro di potassio [KCl], previamente essiccato fino a peso costante in stufa a 180 °C e raffreddato in essiccatore. Sciogliere in poca acqua e travasare quantitativamente la soluzione in un matraccio tarato da 1.000 mL. Portare a volume con acqua avendo cura di ben omogeneizzare la soluzione, la cui normalità N_1, si calcola in base al rapporto:

$$N_1 = \frac{P}{74,552}$$

dove P è la quantità esattamente pesata al mg di cloruro di potassio. Si consiglia di rinnovare la soluzione ogni mese.

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,40).

Nitrato di potassio [KNO_3]. Soluzione satura a temperatura ambiente.

Agar-agar esente da cloruri.

2.5. Procedimento

2.5.1. Pretrattamento

Mediante opportuno pretrattamento possono essere eliminate le interferenze descritte al punto 2.2. Tutti gli alogenuri, fluoruro escluso, possono essere dosati contemporaneamente. Se le concentrazioni di ciascuno sono simili è possibile determinare nell'ordine, sul medesimo campione, ioduri, bromuri e cloruri, tenendo conto dei differenti valori dei prodotti di solubilità e quindi dei differenti potenziali dell'elettrodo indicatore corrispondenti alla fine di ogni titolazione. Nel caso in cui i bromuri e/o gli ioduri siano in eccesso rispetto ai cloruri, essi possono essere rimossi preliminarmente, per mezzo di un trattamento ossidante, ad es. con H_2O_2, all'ebollizione in HNO_3 diluito, seguito da un'estrazione dell'alogeno formatosi con appropriato solvente (ad. es., solfuro di carbonio). La rimozione di sostanze che potrebbero ossidare l'elettrodo d'argento può essere effettuata mediante pretrattamento con acido ascorbico oppure con altra sostanza riducente che non interferisca. L'interferenza dei sali d'ammonio e di ferro può essere prevenuta con un doppio trattamento, in ambiente alcalino, in presenza di H_2O_2, e all'ebollizione, seguito da un'eventuale filtrazione e acidificazione del filtrato con acido nitrico. L'interferenza dei cianuri, tiocianati e solfuri viene ugualmente eliminata con trattamento ossidante in ambiente alcalino, mediante ebollizione prolungata.

2.5.2. Controllo del titolo della soluzione di nitrato d'argento 0,1 N

Prelevare 5 e 10 mL rispettivamente della soluzione standard di KCl 0,1 N e versare in due beaker a forma bassa da 150 mL. Qualora si preveda di eseguire un pretrattamento del campione, occorre effet-

tuare la standardizzazione in presenza delle stesse quantità di tutti i reattivi utilizzati in tale operazione. Addizionare il contenuto di ogni beaker di 2 mL di HNO_3 concentrato, oppure della quantità necessaria per neutralizzare la soluzione, più un eccesso di 2 mL di HNO_3 e di una quantità d'acqua sufficiente a portare il volume a 100 mL circa. Introdurre nel beaker la barretta magnetica, porre il beaker sull'agitatore e iniziare l'agitazione. Immergere l'elettrodo d'argento nella soluzione e ad essa collegare l'elettrodo di riferimento tramite ponte salino. Misurare il potenziale, mediante apparecchiatura potenziometrica, dopo averne verificato lo zero. Aggiungere rispettivamente 4 e 9 mL della soluzione di $AgNO_3$ 0,1 N, continuare ad aggiungere la soluzione di $AgNO_3$, per aliquote successive uguali a 0,1 mL o meglio 0,05 mL e misurare il potenziale avendo cura di attendere, dopo ogni aggiunta, la sua stabilizzazione. Scrivere nelle prime due colonne di una tabella i volumi man mano aggiunti con i corrispondenti potenziali. In una terza colonna registrare gli incrementi successivi del potenziale E, Δ_1E. Su una quarta colonna annotare le differenze successive (Δ_2E) positive o negative, tra gli incrementi di potenziale Δ_1E. La fine della titolazione corrisponde all'aggiunta di $AgNO_3$, che dà il valore massimo di Δ_1E. Per calcolare il volume esatto V_{eq}, della soluzione di $AgNO_3$ corrispondente alla fine della titolazione, applicare la formula:

$$V_{eq} = V_0 + V_1 \cdot p/P$$

dove:

- V_0 = volume, in mL, della soluzione di $AgNO_3$, immediatamente inferiore all'aggiunta che fornisce l'incremento massimo Δ_1E;
- V_1 = volume, in mL, della soluzione di $AgNO_3$ corrispondente all'ultima aliquota aggiunta;
- p = ultimo valore di Δ_2E con il segno +;
- P = somma dei valori assoluti dell'ultimo Δ_2E con il segno + e del primo Δ_2E con il segno -;

Di seguito, a titolo esemplificativo, viene riportato un esempio di calcolo:

Volume della soluzione di $AgNO_3$ mL	Potenziale mV	Δ_1E mV	Δ_2E mV
4,80	176		
		35	
4,90	211		+37
		72	
5,00	283		-49
		23	
5,10	306		-10
		13	
5,20	319		

$$V_{eq} = 4,9 + 0,1 \cdot 37/(37+49) = 4,943$$

Il titolo della soluzione di $AgNO_3$, espresso in normalità, è dato dalla formula:

$$N = N_1 \cdot 5/(V_2-V_3)$$

dove:

- N_1 = titolo, espresso in normalità, della soluzione standard di KCl, in questo caso 0,1 N;
- V_2 = valore, in mL, di V_{eq} corrispondente alla titolazione di 10 mL della soluzione standard di KCl;
- V_3 = valore, in mL, di V_{eq} corrispondente alla titolazione di 5 mL della soluzione standard di KCl;
- 5 = differenza, in mL, tra i due volumi prelevati della soluzione standard di KCl.

2.5.3. Calcolo del valore del bianco

Il valore del bianco dei reagenti, b, è dato, in mL, dalla formula:

$$b = 2V_3 - V_2$$

dove V_2 e V_3 hanno lo stesso significato che al punto 2.5.2.

2.5.4. Titolazione del campione

Titolare il campione, che non deve contenere più di 35 mg di ione cloruro, con la soluzione standard di $AgNO_3$ 0,1 N, secondo le modalità descritte nel controllo del titolo della soluzione di nitrato d'argento 0,1 N, ma senza tener conto dell'istruzione relativa all'aggiunta di 4 e 9 mL della soluzione di $AgNO_3$.

2.6. Espressione dei risultati

La concentrazione degli ioni cloruro nel campione è data dalla formula:

$$Cl^- (meq\ L^{-1}) = \frac{(a - b) \cdot N}{C} \cdot 1.000$$

dove:

- a = volume, in mL, di soluzione standard di $AgNO_3$ consumata per il campione;
- b = volume, in mL, di soluzione standard di $AgNO_3$, consumata per il bianco;
- N = la normalità della soluzione standard di $AgNO_3$;
- C = il volume, in mL, del campione d'acqua prelevato.

Per avere la concentrazione in mg L^{-1}:

$$Cl^- (mg\ L^{-1}) = Cl^- (meq\ L^{-1}) \cdot 35,45$$

2.7. Precisione ed accuratezza

La precisione del metodo può essere aumentata ricorrendo alla potenziometria derivata.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

COBALTO

1. Determinazione per assorbimento atomico con APDC

1.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso tra il cobalto e il pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) ad un determinato pH. La fase organica, ottenuta successivamente per estrazione del complesso con metilisobutilchetone (MIBK), viene aspirata direttamente nella fiamma aria-acetilene di uno spettrofotometro di assorbimento atomico e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 240,7 nm.
Il metodo consente la determinazione nell'intervallo di concentrazione da 0,03 a 10 mg L^{-1}. Concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo opportunamente il campione in esame.

1.2. Interferenze e cause di errore

La presenza di metalli, come ferro, zinco, nichel, piombo, cadmio, rame, manganese, argento, cromo fino ad un totale complessivo di 30 mg L^{-1}, non impedisce la chelazione e l'estrazione quantitativa del cobalto. Particolare attenzione in questa fase deve essere rivolta al controllo del valore del pH. La presenza di detti elementi complessabili, in concentrazioni superiori al citato limite, può provocare un errore in difetto che viene eliminato aggiungendo ulteriori quantità di APDC. In ogni caso ciascuno dei singoli metalli non deve superare, nel campione in esame, la concentrazione di 10 mg L^{-1}.
La maggior parte delle interferenze dovute a sostanze non complessabili dall'APDC, eventualmente presenti nella matrice, vengono eliminate con l'estrazione.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio. Tutta la vetreria impiegata in questa determinazione deve essere lavata con acido nitrico diluito (1+9) caldo e accuratamente risciacquata con acqua. Questa operazione va effettuata immediatamente prima dell'uso.
- Spettrofotometro ad assorbimento atomico munito di bruciatore per fiamma aria-acetilene e corredato possibilmente di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico e di tutti gli altri indispensabili accessori.
- pH-metro, corredato di coppia di elettrodi vetro calomelano.

1.4. Reattivi

I reattivi devono essere di grado ultrapuro o puri per analisi. L'acqua distillata di tipo commerciale deve essere ulteriormente deionizzata (ECw $\leq$ 0,1 µS cm^{-1}).

Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare il MIBK con acqua prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perchè il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro.

Soluzione di pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) (40 g L^{-1}). Sciogliere 4 g di APDC in 100 mL di acqua. Se necessario, purificare l'APDC con uguale volume di MIBK. Agitare per 30 secondi in un imbuto separatore, lasciar separare, recuperare lo strato inferiore e scartare il MIBK. La soluzione deve essere preparata giornalmente.

Soluzione di acido nitrico [HNO_3] (1+1). Aggiungere un volume di HNO_3 concentrato (d = 1,41) ad un uguale volume d'acqua.

Soluzione di acido cloridrico [HCl] (1+1). Aggiungere un volume di HCl concentrato (d = 1,19) ad un ugual volume d'acqua.

Soluzione di HNO_3 1 M. Diluire 45 mL di HNO_3 concentrato e portare e 1.000 mL con acqua.

Soluzione di idrossido di sodio [NaOH] 1 M. Disciogliere 40 g di NaOH in acqua e portare a volume a 1.000 mL.

Soluzione standard madre di cobalto (1 mL = 0,1 mg Co). Sciogliere 0,1 g di metallo (Co) nella minima quantità di HNO_3 (1+1), aggiungere 10 mL di HCl (1+1) e diluire a 1.000 mL con acqua. È possibile fare ricorso a soluzioni standard già pronte o da diluire.

Acqua satura di MIBK. Mescolare una parte di MIBK purificato con una parte di acqua in un imbuto separatore, agitare per 30 secondi, lasciar separare, scartare lo strato acquoso e recuperare lo strato organico.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

Preparare almeno tre concentrazioni di soluzione standard di cobalto, diluendo opportunamente la soluzione standard madre, così da avere la concentrazione del campione in esame compresa in un intervallo di concentrazione ottimale per lo strumento.

Portare 100 mL di ogni standard e 100 mL di un bianco, costituito da acqua esente da metalli, a pH 3 aggiungendo HNO_3 1 M o NaOH 1 M. Trasferire ciascuno standard e il bianco in altrettanti imbuti separatori da 200 mL, addizionare 1 mL di soluzione di APDC e agitare per miscelare. Addizionare 10 mL di MIBK e agitare vigorosamente per 30 secondi (il massimo rapporto consentito tra campione e MIBK è 40/1 in volume). Lasciare separare le fasi nell'imbuto separatore, quindi cautamente aggiungere una soluzione di acqua ed acido nitrico a pH 3 sul fondo di ciascun imbuto in modo da rendere lo strato organico accessibile al tubo di aspirazione del bruciatore. Aspirare gli estratti organici direttamente nella fiamma (azzerando lo strumento con il bianco costituito da acqua satura di MIBK) e registrare le assorbanze. Preparare una curva di taratura mettendo le concentrazioni in ascissa (mg L^{-1}) contro le assorbanze in ordinata.

1.5.2. Determinazione

Portare 100 mL di campione in esame a pH 3 aggiungendo HNO_3 1 M o NaOH 1 M. Trasferire il campione in un imbuto separatore da 200 mL, addizionare 1 mL di soluzione di APDC e agitare per miscelare. Addizionare 10 mL di MIBK e agitare vigorosamente per 30 secondi (il massimo rapporto consentito tra campione e MIBK è 40/1 in volume). Lasciare separare le fasi nell'imbuto separatore, quindi cautamente aggiungere una soluzione di acqua ed acido nitrico a pH 3 sul fondo dell'imbuto, in modo da rendere lo strato organico accessibile al tubo di aspirazione del bruciatore. Aspirare l'estratto organico direttamente nella fiamma e registrare l'assorbanza.

Per evitare problemi associati con l'instabilità del complesso metallico estratto, determinare il cobalto immediatamente dopo l'estrazione.

1.6. Espressione dei risultati

Calcolare la concentrazione del metallo in mg L^{-1}, facendo riferimento alla curva di taratura.

1.7. Precisione ed accuratezza

Con un campione contenente 4 mg L^{-1} di cobalto è stata ottenuta una deviazione standard relativa del 10%.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* XVIII ed. (Washington, APHA).

CROMO

1. Determinazione del cromo totale

1.1. Principio del metodo

Il metodo consiste nella determinazione del cromo totale mediante spettrofotometria di assorbimento atomico alla lunghezza d'onda di 357,9 nm con immissione diretta del campione in fiamma aria-acetilene o ossido di diazoto-acetilene.

Questo metodo consente la determinazione diretta del cromo totale in campioni di acque di scarico e di acque naturali nell'intervallo di concentrazione 0,1÷10 mg L^{-1}. L'intervallo può essere esteso a concentrazioni superiori a 10 mg L^{-1} attraverso la diluizione del campione.

1.2. Interferenze e cause di errore

Ferro, nichel e cobalto (0,1 mg L^{-1} ciascuno) e magnesio (30 mg L^{-1}) provocano interferenza negativa. In soluzione di 8-idrossichinolina (10 g L^{-1}) non interferiscono 700 mg L^{-1} di ferro e 10 mg L^{-1} di nichel e cobalto, nonché 1 g L^{-1} di magnesio.

Interferiscono positivamente il potassio se presente in concentrazioni superiori a 500 mg L^{-1}.

Non interferiscono sodio, solfati e cloruri (ognuno fino a 9 mg L^{-1}), calcio e magnesio (ognuno fino a 1 mg L^{-1}), nitrati (fino a 2 mg L^{-1}) e cadmio, piombo, rame, zinco, ferro, nichel (fino a 10 mg L^{-1} ciascuno). Tuttavia Na^+, Cl^-, $SO_4^{=}$, $HPO_4^{=}$ e sostanze organiche, se presenti in concentrazioni elevate, possono provocare alterazioni nella dinamica di aspirazione del liquido e nelle condizioni chimico-fisiche della fiamma, con ripercussioni negative sulla risposta strumentale.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio. Tra i vari sistemi utilizzabili per il lavaggio della vetreria risulta conveniente quello che impiega acido nitrico diluito (1+3) ed acqua.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico munito di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di lampada a catodo cavo per il cromo, e, possibilmente, di registratore grafico adatto, nonché di bruciatore aria-acetilene o ossido di diazoto-acetilene.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. L'acqua utilizzata deve essere distillata e/o deionizzata.

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Soluzione di acido nitrico diluito (1+3). Aggiungere a 3 volumi di acqua un volume di acido nitrico concentrato.

Soluzione standard di cromo (1 mL = 0,05 mg di Cr). Pesare 0,1414 g di bicromato di potassio [$K_2Cr_2O_7$], previamente essiccato in stufa a 110°C per almeno 2 ore. Sciogliere in acqua, trasferire la soluzione in matraccio tarato da 1.000 mL e portare a volume con acqua.

1.5. Procedimento

Eseguire tutte le operazioni consigliate dal manuale di istruzione per il funzionamento dello spettrofotometro. In particolare per il bruciatore aria-acetilene regolare i flussi dei gas in maniera da ottenere una fiamma leggermente riducente, inserire la lampada per il cromo e selezionare la lunghezza d'onda di 357,9 nm.

Solo nelle condizioni di fiamma leggermente riducente l'assorbanza risulta indipendente dalla stato di ossidazione del cromo.

1.5.1. Taratura
In 5 matracci tarati da 50 mL porre rispettivamente 0; 0,5; 1; 2; 5 mL di soluzione standard di cromo, aggiungere in ogni pallone 1 mL di acido nitrico diluito e portare a volume con acqua. Cosi operando si ottengono soluzioni con contenuto in cromo rispettivamente di: 0; 0,5; 1; 2; 5 mg L^{-1}.
Nebulizzare direttamente in fiamma le soluzioni così preparate. Eseguire la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 357,9 nm.
Costruire il grafico di taratura prendendo per ogni standard il valore medio delle letture di assorbanza, sottratte del valore del bianco.

1.5.2. Determinazione
Procedere alla nebulizzazione in fiamma del campione di acqua ed alla lettura delle assorbanze alla lunghezza d'onda di 357,9 nm. Le misure di assorbanza degli standard debbono essere ripetute prima e dopo le misure di assorbanza del campione.

1.6. Espressione dei risultati
Riportare sul grafico di taratura i valori delle misure effettuate sul campione, sempre dopo aver sottratto il bianco, risalendo in tal maniera alla concentrazione in cromo totale espressa in mg L^{-1}.

1.7. Precisione ed accuratezza
La precisione, espressa come deviazione standard relativa, è mediamente del 10%. Per quanto riguarda l'accuratezza essa è dello stesso ordine di grandezza. Questi dati sono riferiti all'intero intervallo di concentrazioni preso in esame nel presente metodo.

2. Determinazione del cromo(VI)

2.1. Principio del metodo
La formazione del composto Cr(VI)-pirrolidinditiocarbammato permette l'estrazione selettiva in metilisobutilchetone del cromo(VI) rispetto al cromo(III). La successiva distruzione del complesso organico e la solubilizzazione del cromo in soluzione acquosa consente la determinazione tramite spettrofotometria di assorbimento atomico alla lunghezza d'onda di 357,9 nm.
Il metodo consente la determinazione del solo Cr(VI) in campioni di acque naturali e di scarico in un intervallo di concentrazione compreso tra 0,005 e 0,05 mg L^{-1}.
Campioni di acqua di mare possono essere analizzati solo con livelli di cromo(VI) bassi. Concentrazioni più elevate possono essere determinate procedendo ad opportune diluizioni.

2.2. Interferenze e cause di errore
Il metodo può essere affetto da errori in difetto se nel campione sono presenti alte concentrazioni di Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Ag, e Zn che formano complessi con il pirrolidinditiocarbammato d'ammonio.

2.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio. Tra i vari sistemi utilizzabili per il lavaggio della vetreria risulta conveniente quello che impiega acido nitrico diluito (1+3) ed acqua.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico munito di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di lampada a catodo cavo per il cromo, e, possibilmente, di registratore grafico adatto, nonché di bruciatore aria-acetilene o ossido di diazoto-acetilene.
- Imbuti separatori, possibilmente in vetro pirex, da 500 mL.

2.4. Reattivi
Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. L'acqua utilizzata deve essere distillata e/o deionizzata.

Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare il MIBK con acqua prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perchè il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro.

Soluzione di pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) all'1%. Porre 1 g di APDC in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua. Questa soluzione è conservabile in bottiglia scura per circa 2 settimane.

Ammoniaca concentrata [NH_4OH] (d = 0,8).

Soluzione di ammoniaca diluita (1+3). Aggiungere a 3 volumi di acqua un volume di ammoniaca concentrata.

Carte indicatrici di pH per l'intervallo 0÷5.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).

Soluzione di acido cloridrico diluito circa 0,1 M. Prelevare 8 mL di acido cloridrico concentrato e diluire ad 1.000 mL con acqua.

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Soluzione di acido nitrico diluito (1+1). Aggiungere a 1 volume di acqua un volume di acido nitrico concentrato.

Soluzione di cloruro di potassio al 20% m/v. Sciogliere 20 g di cloruro di potassio [KCl] in acqua e portare a 100 mL.

Soluzione concentrata di cromo (1 mL = 0,05 mg di Cr(VI)). Pesare 0,1414 g di dicromato di potassio [$K_2Cr_2O_7$], previamente essiccato in stufa a 110°C per almeno 2 ore. Sciogliere in acqua, trasferire la soluzione in matraccio tarato da 1.000 mL e portare a volume con acqua.

Soluzione diluita di cromo (1 mL = 0,001 mg di Cr(VI)). Prelevare 2 mL della soluzione concentrata, trasferirli in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua. Si consiglia di preparare questa soluzione al momento dell'uso.

2.5. Procedimento

Eseguire tutte le operazioni consigliate dal manuale di istruzione per il funzionamento dello spettrofotometro. In particolare per il bruciatore aria-acetilene regolare i flussi dei gas in maniera da ottenere una fiamma non ossidante, inserire la lampada per il cromo e selezionare la lunghezza d'onda di 357,9 nm.

2.5.1. Preparazione del campione

Trasferire 200 mL del campione da analizzare in un imbuto separatore da 500 mL ed aggiungere 5 mL di soluzione all'1% di APDC in acqua; con cartine indicatrici aggiustare il pH al valori di 3±0,5 con aggiunta di soluzioni diluite di acido cloridrico e/o ammoniaca. Aggiungere 10 mL di MIBK, agitare energicamente per 1 minuto e lasciare riposare.

Recuperare la fase organica e trasferire in beaker da 50 mL.

Effettuare una seconda estrazione e aggiungere la fase organica allo stesso beaker.

Effettuare un lavaggio dell'imbuto separatore con 2 mL di MIBK ed aggiungere la fase organica allo stesso beaker.

Portare il beaker su bagno termostatato a 50÷60°C sino a completa evaporazione del MIBK.

Aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato avendo cura di disciogliere tutto il residuo presente. Portare il beaker su bagno termostatato a 95°C sino a completa evaporazione dell'acido nitrico.

Aggiungere 2 mL di acido nitrico diluito e riscaldare per 1 minuto, lasciare raffreddare e portare a volume di 10 mL in pallone tarato agitando bene per l'omogenizzazione.

2.5.2. Taratura

Trasferire in altrettanti imbuti separatori da 500 mL 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 mL della soluzione diluita di cromo. Portare con acqua il volume a 200 mL ottenendo standard di 0; 5; 12,5; 25; 3,75; 50 $\mu g\ L^{-1}$ Cr.

Aggiungere 5 mL di soluzione all'1% di APDC in acqua; con cartine indicatrici aggiustare il pH al valori di 3±0,5 con aggiunta di soluzioni diluite di acido cloridrico e/o ammoniaca. Aggiungere 10 mL di MIBK, agitare energicamente per 1 minuto e lasciare riposare.
Recuperare la fase organica e trasferire in beaker da 50 mL.
Effettuare una seconda estrazione e aggiungere la fase organica allo stesso beaker.
Effettuare un lavaggio dell'imbuto separatore con 2 mL di MIBK ed aggiungere la fase organica allo stesso beaker.
Portare il beaker su bagno termostatato a 50÷60°C sino a completa evaporazione del MIBK.
Aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato avendo cura di disciogliere tutto il residuo presente.
Portare il beaker su bagno termostatato a 95°C sino a completa evaporazione dell'acido nitrico.
Aggiungere 2 mL di acido nitrico diluito e riscaldare per 1 minuto, lasciare raffreddare e portare a volume di 10 mL in pallone tarato agitando bene per l'omogenizzazione.
Le soluzioni così ottenute vengono nebulizzate in fiamma. Eseguire la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 357,9 nm.
Costruire il grafico di taratura prendendo per ogni standard il valore medio delle letture di assorbanza, sottratte del valore del bianco.

2.5.3. Determinazione

Procedere alla nebulizzazione in fiamma del campione proveniente dal punto 2.5.1. ed alla lettura delle assorbanze alla lunghezza d'onda di 357,9 nm. Le misure di assorbanza degli standard debbono essere ripetute prima e dopo le misure di assorbanza del campione.

2.6. Espressione dei risultati

Riportare sul grafico di taratura i valori delle misure effettuate sul campione, sempre dopo aver sottratto il bianco, risalendo in tal maniera alla concentrazione in cromo(VI) espressa in $\mu g\ L^{-1}$.

2.7. Precisione ed accuratezza

La precisione del metodo risulta di circa il 20% come deviazione standard percentuale, a livello di concentrazione di Cr(VI) di 10 $\mu g\ L^{-1}$ per campioni di acqua a diversa salinità e concentrazione. L'accuratezza può essere espressa da un errore relativo inferiore al 10%.

3. Determinazione del cromo(III)

3.1. Principio del metodo

Il metodo consiste nella separazione ed eliminazione del Cr(VI) dal campione mediante estrazione del complesso APDC-Cr(VI) e successiva determinazione del Cr(III) mediante spettrofotometria di assorbimento atomico in fiamma alla lunghezza d'onda di 357,9 nm.
Il metodo consente la determinazione del Cr(III) in acque naturali e di scarico (escluse le acque di mare) nell'intervallo di concentrazione 0,1÷10 $mg\ L^{-1}$. Concentrazioni maggiori possono essere rilevate previa diluizione del campione.

3.2. Interferenze e cause di errore

Ferro, nichel e cobalto (0,1 $mg\ L^{-1}$ ciascuno) e magnesio (30 $mg\ L^{-1}$) provocano interferenza negativa. In soluzione di 8-idrossichinolina (10 $g\ L^{-1}$) non interferiscono 700 $mg\ L^{-1}$ di ferro e 10 $mg\ L^{-1}$ di nichel e cobalto, nonché 1 $g\ L^{-1}$ di magnesio.
Interferiscono positivamente il potassio se presente in concentrazioni superiori a 500 $mg\ L^{-1}$.
Non interferiscono sodio, solfati e cloruri (ognuno fino a 9 $mg\ L^{-1}$), calcio e magnesio (ognuno fino a 1 $mg\ L^{-1}$) nitrati (fino a 2 $mg\ L^{-1}$) e cadmio, piombo, rame, zinco, ferro, nichel (fino a 10 $mg\ L^{-1}$ ciascuno). Tuttavia Na^+, Cl^-, $SO_4^=$, $HPO_4^=$ e sostanze organiche, se presenti in concentrazioni elevate, possono provocare alterazioni nella dinamica di aspirazione del liquido e nelle condizioni chimico-fisiche della fiamma, con ripercussioni negative sulla risposta strumentale.

3.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio. Tra i vari sistemi utilizzabili per il lavaggio della vetreria risulta conveniente quello che impiega acido nitrico diluito (1+3) ed acqua.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico munito di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di lampada a catodo cavo per il cromo, e, possibilmente, di registratore grafico adatto, nonché di bruciatore aria-acetilene o ossido di diazoto-acetilene.
- Imbuti separatori, possibilmente in vetro pirex, da 500 mL.

3.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. L'acqua utilizzata deve essere distillata e/o deionizzata.

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Soluzione di acido nitrico diluito (1+3). Aggiungere a 3 volumi di acqua un volume di acido nitrico concentrato.

Ammoniaca concentrata [NH_4OH] (d = 0,8).

Soluzione di ammoniaca diluita (1+3). Aggiungere a 3 volumi di acqua un volume di ammoniaca concentrata.

Carte indicatrici di pH per l'intervallo 0÷5.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).

Soluzione di acido cloridrico diluito circa 0,1 M. Prelevare 8 mL di acido cloridrico concentrato e diluire ad 1.000 mL con acqua.

Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare il MIBK con acqua prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perchè il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro.

Soluzione di pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) all'1%. Porre 1 g di APDC in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua. Questa soluzione è conservabile in bottiglia scura per circa 2 settimane.

Soluzione standard di cromo (1 mL = 0,05 mg di Cr). Pesare 0,1414 g di bicromato di potassio [$K_2Cr_2O_7$], previamente essiccato in stufa a 110°C per almeno 2 ore. Sciogliere in acqua, trasferire la soluzione in matraccio tarato da 1.000 mL e portare a volume con acqua.

3.5. Procedimento

Eseguire tutte le operazioni consigliate dal manuale di istruzione per il funzionamento dello spettrofotometro, inserire la lampada per il cromo e selezionare la lunghezza d'onda di 357,9 nm.

3.5.1. Preparazione del campione

Trasferire 200 mL del campione da analizzare in un imbuto separatore da 500 mL ed aggiungere 5 mL di soluzione all'1% di APDC; con cartine indicatrici aggiustare il pH al valori di 3±0,5 con aggiunta di soluzioni diluite di acido cloridrico e/o ammoniaca. Aggiungere 10 mL di MIBK, agitare energicamente per 1 minuto e lasciare riposare.

Recuperare la fase organica e trasferire in beaker da 50 mL.

Effettuare una seconda estrazione e aggiungere la fase organica allo stesso beaker.

Effettuare un lavaggio dell'imbuto separatore con 2 mL di MIBK ed aggiungere la fase organica allo stesso beaker.

Per la determinazione del cromo(III) la fase acquosa viene trattata come riportato al punto 3.5.3. mentre la fase organica può essere utilizzata per la determinazione del cromo(VI).

3.5.2. Taratura

In 5 matracci tarati da 50 mL porre rispettivamente 0; 0,5; 1; 2; 5 mL di soluzione standard di cromo, aggiungere in ogni pallone 1 mL di acido nitrico diluito e portare a volume con acqua. Cosi operando si ottengono soluzioni con contenuto in cromo rispettivamente di: 0; 0,5; 1; 2; 5 mg L^{-1}.

Le soluzioni così preparate vengono nebulizzate direttamente in fiamma. Eseguire la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 357,9 nm.
Costruire il grafico di taratura prendendo per ogni standard il valore medio delle letture di assorbanza, sottratte del valore del bianco.

3.5.3. Determinazione
Procedere alla nebulizzazione in fiamma del campione proveniente dal punto 3.5.1. ed alla lettura delle assorbanze alla lunghezza d'onda di 357,9 nm. Le misure di assorbanza degli standard debbono essere ripetute prima e dopo le misure di assorbanza del campione.

3.6. Espressione dei risultati
Riportare sul grafico di taratura i valori delle misure effettuate sul campione, sempre dopo aver sottratto il bianco, risalendo in tal maniera alla concentrazione in cromo(III) espressa in mg L^{-1}.

3.7. Precisione ed accuratezza
Prove effettuate presso 6 laboratori differenti su campioni di acque di scarico con concentrazioni medie di 2 mg L^{-1} hanno mostrato valori di precisione (come deviazione standard relativa) e accuratezza (come scarto teorico) inferiori al 5%.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).
CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100. (Roma).

FERRO

1. Determinazione per assorbimento atomico (acque dolci)

1.1 Principio del metodo

Il ferro viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 248,3 nm.

Questo metodo consente la determinazione del ferro, disciolto o solubilizzabile con i trattamenti indicati in seguito, nell'intervallo di concentrazione da 0,05 a 5 mg L^{-1} di Fe. L'intervallo che fornisce i risultati più attendibili è compreso tra 0,6 e 5 mg L^{-1}. Per concentrazioni superiori a 5 mg L^{-1} è possibile rientrare in detto intervallo ricorrendo alla diluizione del campione.

Il metodo è applicabile alle acque naturali e di scarico

1.2. Interferenze e cause di errore

Sodio, potassio, bario, cloruri, solfati non interferiscono se presenti fino a 5 mg L^{-1} ciascuno.

Cromo, manganese, cobalto, nichel, rame, zinco, palladio, argento, cadmio, stagno, piombo, litio, mercurio, selenio, alluminio, antimonio, arsenico, vanadio, boro, molibdeno non interferiscono se presenti fino a 100 mg L^{-1} ciascuno.

Nelle condizioni del metodo viene eliminata l'interferenza dovuta alla silice se presente fino a 200 mg L^{-1}.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato possibilmente di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di bruciatore standard per aria-acetilene e di tutti gli altri accessori necessari.

1.4. Reattivi

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Acido nitrico diluito (1+199). Aggiungere 1 volume di HNO_3 concentrato a 199 volumi di acqua.

Soluzione standard concentrata di ferro (1,0 mL = 1,0 mg di Fe). Sciogliere 1 g (precisione 0,1 mg) di ferro puro in 100 mL di HCl (1+1) riscaldando. Raffreddare e diluire a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard diluita di ferro (1,0 mL = 0,1 mg di Fe). Diluire 100 mL della soluzione standard concentrata di ferro e 5 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard molto diluita di ferro (1,0 mL = 0,01 mg di Fe). Diluire 100 mL della soluzione standard diluita di ferro e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

1.5. Procedimento

Eseguire le operazioni consigliate nel manuale di istruzione dello strumento e selezionare la lunghezza d'onda di 248,3 nm.

1.5.1. Taratura

È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio e alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente, la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.

1.5.1.1. Taratura per la determinazione del ferro disciolto

Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker 100 mL

di acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di ferro nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni del ferro, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.1.2. Taratura per la determinazione del ferro dopo trattamento con acido cloridrico
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di ferro nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido cloridrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura, aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni del ferro, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.1.3. Taratura per la determinazione del ferro dopo trattamento ripetuto con acido nitrico
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di ferro nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare i beaker e aggiungere altri 5 mL di acido nitrico. Coprire i beaker con vetrini da orologio e ripetere il trattamento lo stesso numero di volte necessario per ottenere la digestione completa del campione.
Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti dei beaker e i vetrini da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matracci tarati. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare la lettura delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni del ferro, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti dal valore del bianco.

1.5.2. Determinazione
1.5.2.1. Determinazione del ferro disciolto
Aspirare, per effettuare la lettura dell'assorbanza, il campione, filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 µm e a cui sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro.

1.5.2.2. Determinazione del ferro dopo trattamento con acido cloridrico
Porre in un beaker 100 mL di campione, filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 µm e a cui sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro.
Aggiungere 5 mL di acido cloridrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare la soluzione ed effettuare le letture delle assorbanze.

1.5.2.3. Determinazione del ferro dopo trattamento ripetuto con acido nitrico

Porre in un beaker 100 mL di campione, filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 μm e a cui sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro.

Aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare il beaker e aggiungere altri 5 mL di acido nitrico. Coprire il beaker con vetrino da orologio e ripetere il trattamento il numero di volte necessario per ottenere la digestione completa del campione (ciò è indicato da un residuo debolmente colorato).

Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti del beaker e il vetrino da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matraccio tarato. Aspirare la soluzione ed effettuare la lettura delle assorbanze.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurato e corretto del valore del bianco, attraverso il grafico di taratura, si risale alla concentrazione del ferro espressa in mg L^{-1}.

1.7. Precisione ed accuratezza

Prove effettuate da tre differenti laboratori su campioni di acque di scarico prima e dopo aggiunta di quantità note di ferro (in modo da ottenere campioni con concentrazione di circa 2 mg L^{-1}) hanno dato valori della deviazione standard relativa compresi tra 0,9 e 7.8% e recuperi relativi delle quantità aggiunte compresi tra il 99 e il 100%.

2. Determinazione colorimetrica (acque marine)

2.1. Principio del metodo

Il ferro(III), in ambiente tamponato a pH 4, viene ridotto a Fe(II) dal cloruro di idrossilammonio e forma con il complessante 4,7-difenile-1,10-fenantrolina (batofenantrolina) un complesso colorato che viene estratto in alcool isoamilico e può essere determinato spettrofometricamente alla lunghezza d'onda di 533 nm.

Il metodo consente la determinazione del ferro per concentrazioni di 1,4÷200 μg L^{-1}, purché si utilizzino per determinazione celle con cammino ottico opportuno: 10 cm fino a 70 μg L^{-1}, 5 cm fino a ≈ 140 μg L^{-1}, e 1 cm per concentrazioni superiori a 140 μg L^{-1}.

2.2. Interferenze e cause di errore

Le sostanze maggiormente interferenti sono le quelle fortemente ossidanti e/o riducenti che reagiscono con l'idrossilammina, e i metalli che vengono complessati dalla batofenantrolina. Tuttavia in acque marine, tali sostanze ed elementi non dovrebbero essere presenti in concentrazioni tali da produrre interferenze.

Non interferiscono manganese, alluminio, zinco, magnesio, sodio, silice nitrati e ortofosfati, se presenti in concentrazione inferiore a 1 mg L^{-1} e inoltre non interferiscono solfati, nitrati, acetati e perclorati.

Il cobalto, alle condizioni di pH utilizzate, forma un complesso di colore giallo che comunque non viene estratto nella fase alcolica, mentre il rame forma un complesso incolore.

Nel caso in cui si voglia determinare solo il ferro solubile è necessario filtrare, possibilmente sul posto, il campione attraverso una membrana da 0,45 μm e procedere all'analisi quanto prima.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro che consenta misure a 533 nm dotato di celle aventi cammino ottico da 1 a 10 cm.
- Imbuti separatori con rubinetto in teflon.

2.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi, l'acqua deve essere bidistillata, in distillatore di quarzo, o deionizzata e distillata.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,17).

Soluzione diluita di acido cloridrico, 0,48 N. Versare cautamente 21 mL di acido cloridrico concentrato in 400 mL di acqua e portare poi il volume a 500 mL in un matraccio tarato. Conservare la soluzione in bottiglie di polietilene.

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d =1,42).

Soluzione di cloruro di idrossilammonio al 10%. Sciogliere 10 g di cloruro di idrossilammonio [$NH_2OH{\bullet}HCl$] in 100 mL di acqua. Impurezze di ferro eventualmente presenti possono essere eliminate attraverso successive aggiunte di 5 mL di soluzione di batofenantrolina ed estrazioni con alcool isoamilico. Tale procedura deve essere ripetuta fino a quando la fase organica non risulti incolore. Conservare la soluzione in bottiglie di polietilene.

Acido acetico glaciale [CH_3COOH] (d = 1,05).

Soluzione tampone di acetato di ammonio. Sciogliere 250 g di acetato di ammonio [CH_3COONH_4] in 150 ml di acqua e aggiungere 700 mL di acido acetico glaciale. Anche in questo caso impurezze di ferro presenti possono essere eliminate come descritto precedentemente. Conservare in bottiglie di polietilene.

Soluzione di batofenantrolina 0.035%. Sciogliere 0,070 g di batofenantrolina [4,7-difenile-1,10-fenantrolina] in 100 mL di alcool etilico e, quindi aggiungere 100 mL di acqua. La soluzione, conservata in bottiglie di polietilene, è stabile indefinitamente.

Alcool iso-amilico [$(CH_2)_2CHCH_2CH_2OH$] (d = 0.81).

Soluzione standard concentrata di Fe (1 mL = 1 mg). Utilizzare come standard di Fe la soluzione disponibile in commercio per assorbimento atomico, oppure prepararla sciogliendo in poca acqua contenente 6 mL di acido nitrico concentrato, 702 mg di solfato di ferro(II) e ammonio [$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2{\bullet}6H_2O$] e portare il volume a 100 mL in un matraccio tarato.

Soluzione standard diluita di Fe (1 mL = 0,002 mg). Prelevare 1 mL della soluzione standard concentrata di Fe e trasferire in un matraccio da 500 mL contenete poca acqua e 3 mL di HNO_3 concentrato, diluire infine il volume a 500 mL.

Acetone [CH_3COCH_3] (d = 0.79).

Acqua di mare sintetica. Sciogliere in 1.000 mL di acqua i seguenti sali: NaCl 24,53 g; $MgCl_2{\bullet}6\ H_2O$ 11,1 g; Na_2SO_4 4,09 g; $CaCl_2{\bullet}2H_2O$ 1,54 g; KCl 0,69 g; $NaHCO_3$ 0,2 g; KBr 0,1 g; H_3BO_3 0,03 g; $SrCl_2{\bullet}6H_2O$ 0,05 g; NaF 0,003 g.

2.5 Procedimento

2.5.1. Taratura

Preparare le soluzioni standard per la costruzione della retta di taratura per diluizione della soluzione standard diluita. A tal fine introdurre in 5 matracci da 100 mL, contenenti 7 mL di acido cloridrico diluito 0,48 N, quantità note della soluzione standard diluita di Fe e precisamente: 0 (bianco); 0,5; 1; 2; 3 mL e portare a volume con acqua di mare naturale o sintetica esente da Fe. Le soluzioni così preparate hanno una concentrazione rispettivamente pari a: 0; 10; 20; 40; 60 $\mu g\ L^{-1}$.

Agitare e versare le soluzioni in 5 diversi imbuti separatori da 250 mL, aggiungere 2 mL di soluzione di cloruro di idrossilammonio al 10% e lasciar riposare per 5 minuti. Aggiungere 6 mL di soluzione tampone di acetato di ammonio, in modo da portare il pH a 4, e 5 mL di soluzione di batofenantrolina 0,035%. Agitare e lasciar riposare per 10 minuti. Aggiungere infine 20 mL di alcool iso-amilico, agitare vigorosamente per 1 minuto e lasciar stratificare le due fasi per almeno 5 minuti.

Raccogliere la fase acquosa sottostante in una seconda serie di imbuti separatori e la fase organica in cilindri graduati da 50 mL. Alla fase acquosa raccolta nella seconda serie di imbuti separatori aggiungere 2 mL di cloruro di idrossilammonio al 10% e 2 mL di soluzione di batofenantrolina. Procedere ad una ulteriore estrazione con 10 mL di alcool isoamilico.

Riunire le due fasi organiche nei cilindri e portare a 35 mL con aggiunta di acetone che elimina il rischio di intorbidimento delle soluzioni, dovuto alla presenza di goccioline di acqua.
Leggere le assorbanze a 533 nm, dopo almeno 10 minuti con celle da 10 cm.
Costruire la curva di taratura, riportando su un grafico, in ascissa le concentrazioni di Fe e in ordinata i corrispondenti valori delle assorbanze, corretti del valore del bianco.

2.5.2. Determinazione
Trasferire 100 mL del campione in un imbuto separatore da 250 mL.
Acidificare a pH < 2 con 10 mL di acido cloridrico diluito ed aspettare una notte per assicurare la completa ridissoluzione di tutte le forme colloidali degli idrossidi di ferro.
Aggiungere 2 mL di soluzione di cloruro di idrossilammonio al 10% e lasciar riposare per 5 minuti.
Aggiungere 6 mL di soluzione tampone di acetato di ammonio, in modo da portare il pH a 4, e 5 mL di soluzione di batofenantrolina 0,035%. Agitare e lasciar riposare per 10 minuti. Aggiungere infine 20 mL di alcool iso-amilico, agitare vigorosamente per 1 minuto e lasciar stratificare le due fasi per almeno 5 minuti.
Raccogliere la fase acquosa sottostante in un secondo imbuto separatore e la fase organica in un cilindro graduato da 50 mL. Alla fase acquosa raccolta nel secondo imbuto separatore aggiungere 2 mL di cloruro di idrossilammonio al 10% e 2 mL di soluzione di batofenantrolina. Procedere ad una ulteriore estrazione con 10 mL di alcool isoamilico.
Riunire le due fasi organiche nel cilindro e portare a 35 mL con aggiunta di acetone che elimina il rischio di intorbidimento della soluzione, dovuto alla presenza di goccioline di acqua.
Leggere l'assorbanza a 533 nm, dopo almeno 10 minuti con celle da 10 cm.

2.6. Espressione dei risultati
Dal valore dell'assorbanza ottenuta per il campione in esame, corretto del valore del bianco, si ricava, dalla curva di taratura la concentrazione del Fe in $\mu g\ L^{-1}$.

2.7. Precisione ed accuratezza
La precisione del metodo varia con la quantità di ferro presente.

Bibliografia

CNR-IRSA (1983), *Metodi di analisi per acque di mare*, Quaderno 59 (Roma).
CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100. (Roma).
GRASSHOFF K., EHRHARDT M. KREMLING K. (1983), *Methods of Seawater Analysis*, II Ed. Verlag.Chemie.

FLUORURI

1. Determinazione potenziometrica

1.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla misura della f.e.m. di una cella costituita da un elettrodo di riferimento - il cui potenziale è pertanto rigorosamente noto e riproducibile - e da un elettrodo indicatore dello ione fluoruro entrambi in contatto con una soluzione nella quale sia presente lo ione da determinare. L'elettrodo indicatore è del tipo a membrana a cristallo singolo di fluoruro di lantanio. Dalla misura della f.e.m., conoscendo il valore del potenziale dell'elettrodo di riferimento impiegato, si può calcolare il potenziale dell'elettrodo indicatore e da questo l'attività e la concentrazione dello ione fluoruro, in quanto correlate al valore del potenziale dall'equazione:

$$E = E^* - 2{,}3 \cdot \frac{RT}{F} \cdot \log a_F = E^* - 2{,}3 \cdot \frac{RT}{F} \cdot \log (C_F \cdot f_F)$$

dove:

E	=	potenziale dell'elettrodo indicatore;
E^*	=	valore costante che deriva dalla costituzione dell'elettrodo in soluzioni ad attività nota di F^-;
R	=	costante dei gas;
T	=	temperatura in gradi Kelvin;
F	=	Faraday;
$2{,}3RT/F$	=	59,16 mV(a 25° C);
a_F, C_F, f_F	=	sono rispettivamente l'attività, la concentrazione ed il coefficiente di attività dello ione fluoruro nella soluzione in esame.

Poiché la determinazione della concentrazione richiede la conoscenza del coefficiente di attività, si opera con il metodo della retta di taratura determinando la f.e.m. e quindi il potenziale dell'elettrodo indicatore in soluzioni a concentrazione variabile e nota di fluoruro e a forza ionica costante pari a quella della soluzione in esame. A tal fine la soluzione a concentrazione incognita, ed alcune soluzioni di fluoruro a titolo noto vengono diluite (1+1) con una soluzione tampone (pH 5÷5,5) ad elevata forza ionica, in modo da livellare eventuali differenze fra la forza ionica del campione e degli standard, dovute alla mancata conoscenza della forza ionica del primo. Tale operazione ha anche il vantaggio di utilizzare le condizioni di pH ottimali per la determinazione ed inoltre, in relazione alla composizione della soluzione tampone, di ridurre le difficoltà connesse alla possibile complessazione dello ione fluoruro da parte di ioni metallici che lo trasformano in specie rispetto alle quali l'elettrodo a membrana non risulta più indicatore. Nel caso di scarichi industriali fortemente basici (pH 12) è necessario sostituire una parte del volume della soluzione tampone con una uguale aliquota di HCl 1N, aggiungendo al volume v di campione HCl fino a pH 8 e portando al volume finale 2v con la soluzione tampone.
Il metodo si applica alla determinazione dei fluoruri in acque naturali, di scarico e salmastre nell'intervallo di concentrazione 0,1÷1.000 mg L^{-1}.

1.2. Interferenze e cause di errore

Nel caso si ipotizzi la presenza dello ione fluoborato (o introdotto come tale o formatosi) e si voglia determinare il fluoruro totale, il campione prima dell'analisi deve essere distillato per consentire la trasformazione del fluoborato in fluoruro.
Lo stesso accorgimento deve impiegarsi nel caso della presenza di composti fluoro-organici o comunque quando si abbiano dubbi o notizie non complete sulla forma in cui il fluoruro è presente, tenendo

conto del fatto che il tampone di forza ionica preserva soltanto dalla complessazione del fluoruro da parte di cationi polivalenti come Al(III), Fe(III), e dalla interferenza di fosfati e Si(IV) nonché di polifosfati e Cr(III) purché questi siano presenti a concentrazioni inferiori di 500 mg L^{-1} ed i fluoruri siano invece presenti a concentrazioni superiori a 5 g L^{-1}. Se queste due condizioni non sono rispettate entrambe le interferenze producono valori sperimentali in difetto rispetto ai valori teorici.
I tensioattivi cationici, anionici e non ionici, se presenti rispettivamente a concentrazioni maggiori di 50, 400 e 1.000 mg L^{-1}, interferiscono producendo valori in difetto di fluoruri.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Elettrodo selettivo per lo ione fluoruro disponibile in commercio.
- Elettrodo di riferimento, a calomelano o ad Ag/AgCl del tipo a fibra con pareti di materiale diverso dal vetro.
- Agitatore magnetico con barretta ricoperta di teflon.
- Apparecchio di distillazione.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere distillata e deionizzata.

Soluzione di idrossido di sodio 5 N. Sciogliere in 1.000 mL di acqua circa 200 g di idrossido di sodio [NaOH].

Acido acetico glaciale [CH_3COOH] (d= 1,05).

Acido trans-1,2-diamminocicloesan-N,N,N,N-tetracetico (CyDTA).

Acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84).

Soluzioni tampone. Aggiungere a circa 500 mL di acqua distillata 57 mL di acido acetico glaciale, 58 g di NaCl e 0,30 g di citrato di sodio biidrato [$C_6H_7NaO_7 \bullet H_2O$]. Raffreddare a temperatura ambiente dopo aver agitato bene la soluzione per facilitare la dissoluzione dei composti aggiunti, e portare a pH 5,0÷5,5 con circa 150 mL di una soluzione di NaOH 5 N. Trasferire la soluzione in un pallone da 1.000 mL e portarla a volume. Nel caso si operi su acque ad elevato contenuto salino (forza ionica ≥ 0,5 M) la concentrazione del cloruro di sodio nel tampone deve essere adeguatamente innalzata fino ad un valore pari a circa il doppio di quello del sale nelle acque in esame. Nel caso di concentrazioni in fluoruro dell'ordine di grandezza di 0,1÷1 mg L^{-1} è opportuno sostituire il citrato di sodio con l'acido trans-1,2-diamminocicloesan-N,N,N,N,-tetracetico (CyDTA) che va aggiunto nella quantità di 2 g per 1 L di soluzione tampone. Ove infine vengano analizzate acque per le quali si prevede un rapporto F^-/ioni metallici particolarmente basso (10^{-3}÷10^{-4}) le quantità di citrato di sodio indicate devono essere aumentate di un fattore 10÷50.

Soluzione standard di NaF (1 mL = 0,1 mg di F). Sciogliere 221,1 mg di fluoruro di sodio anidro (NaF) (seccato a 105°C per due ore e raffreddato in essiccatore) e diluire a 1.000 mL con acqua. Diluire 1, 5, 10, e 20 mL della soluzione precedente a 1.000 mL, ottenendo soluzioni standard con le seguenti concentrazioni in fluoruro: 0,1; 0,5; 1; 2 mg L^{-1}. Conservare le soluzioni in bottiglie di teflon o di polietilene. I valori della concentrazione di tali soluzioni standard sono stabiliti sulla base dell'intervallo di concentrazione dei fluoruri, poiché il metodo ha un intervallo di applicazione assai esteso (0.1÷1.000 mg L^{-1}). Ove si debba operare a concentrazioni maggiori, adeguare i valori delle soluzioni standard a quelli da determinare.

1.5. Procedimento

1.5.1. Distillazione

Per eliminare le eventuali impurezze di fluoruro presenti nell'apparecchiatura e per normalizzare le condizioni operative, introdurre nel pallone di distillazione 400 mL di acqua e, attraverso l'imbuto di carico, lentamente 200 mL di acido solforico concentrato. Introdurre anche una barretta magnetica di teflon di circa 2 cm. Preliminarmente disporre sotto il pallone l'agitatore elettromagnetico provvisto di vaschetta di refrigerazione. Terminata l'operazione di carico sostituire il sistema refrigerazione-agita-

zione con il mantello riscaldante e portare la temperatura del liquido, all'interno del pallone, a 180°C precisi. Distillare i 400 mL di acqua e scartare il distillato.
Allontanare il mantello riscaldante ed inserire sotto il pallone il sistema refrigerazione-agitazione (conviene aggiungere all'acqua della vaschetta alcuni pezzi di ghiaccio).
Quando la temperatura all'interno del pallone è scesa sotto i 30°C, aggiungere attraverso l'imbuto di carico e mantenendo l'agitazione il campione di acqua in esame (ad es. 300 mL). Risostituire il sistema refrigerazione-agitazione con il mantello riscaldante ed iniziare la distillazione lentamente finchè la temperatura del liquido, all'interno del pallone, non raggiunga i 180°C. Per evitare un eccessivo passaggio di acido solforico nel distillato evitare che la temperatura superi i 180°C. Raccogliere il distillato in un cilindro graduato e sottoporlo alla determinazione del fluoruro.

1.5.2. Metodo della retta di taratura
Introdurre 10 mL di ciascuna delle soluzioni standard di fluoruro (0,1; 0,5; 1; 2 mg L^{-1} di NaF) in altrettanti beaker insieme a 10 mL della soluzione tampone. Agitare la soluzione per 30 secondi e misurare la f.e.m. in quiete, dopo che il suo valore si è stabilizzato. Questo accorgimento dovrà applicarsi in tutte le altre misure di f.e.m. previste dal metodo. Quando il segnale si è stabilizzato (il tempo di attesa è tanto maggiore quanto più bassa è la concentrazione di fluoruro) riportare il valore in ordinata in funzione del logaritmo della concentrazione, tracciando la retta che passa fra i quattro punti sperimentali.
Prelevare 10 mL del campione in esame, aggiungere 10 mL della soluzione tampone e misurare la f.e.m. Effettuare la taratura e la misura alla medesima temperatura.

1.5.3. Metodo dell'aggiunta
Prelevare 10 mL del campione in esame, aggiungere 10 mL della soluzione tampone e misurare la f.e.m. di questa soluzione. Aggiungere 5 mL di una soluzione standard di fluoruro la cui concentrazione sia circa da 10 a 100 volte maggiore di quella incognita ed altri 5 mL di soluzione tampone. Misurare nuovamente la f.e.m. che risulta maggiore e determinare la variazione ΔE.

1.5.4. Metodo delle aggiunte multiple
Diluire 10 mL di campione con 10 mL della soluzione tampone. Aggiungere, fino ad un totale di 10 mL, 1 mL per volta di una soluzione standard di NaF con concentrazione in ione fluoruro da 10 a 100 volte maggiore del campione in esame e diluita 1:1 con la soluzione tampone. Agitare dopo ogni aggiunta e leggere il valore della f.e.m. Riportare in grafico, in funzione del volume aggiunto (V) di soluzione standard, la grandezza

$$(V+20) \cdot 10^{E/59,1}$$

dove E è la f.e.m. misurata (in mV) dopo ogni aggiunta e 20 è il volume iniziale in mL. Si ottiene un retta che, estrapolata sull'asse delle ascisse, fornisce un volume V_s di valore negativo sul grafico.

1.6. Espressione dei risultati
Se si è utilizzato il metodo della retta di taratura con il valore di f.e.m. misurata entrare nella retta di taratura il valore della ascissa corrispondente, dal quale ricavare la concentrazione in ione fluoruro del campione in esame espresso in mg L^{-1}.

Se si è utilizzato il metodo dell'aggiunta ricavare la concentrazione dello ione fluoruro, espressa in mg L^{-1} dalla relazione:

$$\Delta E = 59,1 \cdot \log \frac{Q \cdot 0,33+0,17}{Q \cdot 0,50}$$

da cui:

$$C_x = C_n \bullet \frac{0,17}{0,50 \bullet 10^{\Delta E/59,1} - 0,33}$$

dove:

C_x	=	concentrazione incognita;
C_n	=	concentrazione della soluzione standard aggiunta;
Q	=	C_x/C_n;
0,33; 0,17; 0,50	=	risultano da 10/30, 5/30 e 10/20 in relazione ai volumi impiegati per la prima determinazione e per l'aggiunta.

Se si è utilizzato il metodo delle aggiunte multiple ricavare la concentrazione dello ione fluoruro (C_x) espressa in mg L^{-1} dall'espressione:

$$C_x = \frac{C_n \bullet V_s}{20}$$

dove 20 è il volume iniziale in mL della soluzione e C_n è la concentrazione della soluzione standard impiegata per le aggiunte e V_s deriva da 1.5.4.

1.7. Precisione ed accuratezza

L'accuratezza varia secondo il metodo impiegato ed è comunque compresa fra +3 e +7%; risultati più accurati si ottengono con il metodo delle aggiunte multiple. Per quanto concerne la precisione non ci sono per il momento dati disponibili.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

FOSFORO

1. Determinazione colorimetrica (fosforo solubile)

1.1. Principio del metodo

Il fosforo nelle acque è presente quasi esclusivamente come fosfato, in particolare ortofosfato, fosfato condensato (piro-, meta-, polifosfato) e fosfato legato a composti organici. Queste specie possono trovarsi in forma solubile ed in forma particellata.

Gli ioni ortofosfato reagiscono con il molibdato di ammonio ed il tartrato di ossido di antimonio e potassio, in ambiente acido, formando un eteropoliacido che viene ridotto con acido ascorbico a blu di molibdeno, intensamente colorato.

Il metodo può essere impiegato per acque naturali, comprese le acque marine, in un intervallo di concentrazione di fosforo compreso tra 0,03 e 0,3 mg L^{-1}.

Per campioni a concentrazione fino a 5 volte inferiore a 0,03 mg L^{-1} occorre impiegare vaschette con cammino ottico maggiore di 1 cm ed effettuare la taratura con standard opportunamente diluiti.

1.2. Interferenze e cause di errore

Il Cu(II) ed il Fe(III) non interferiscono se presenti in quantità inferiori rispettivamente a 10 e 50 mg L^{-1}; il Cr(VI) ed i nitriti danno interferenza negativa pari al 3% se presente in concentrazione superiore ad 1 mg L^{-1} ed al 10÷15%, se superiore a 10 mg L^{-1}; solfuri e composti del silicio non interferiscono se presenti in concentrazioni inferiori rispettivamente a 1 (S) e 10 (SiO_2) mg L^{-1}; per quanto concerne i composti del silicio, 20 mg L^{-1} di SiO_2 corrispondono a circa 0,005 mg L^{-1} di P; gli arseniati interferiscono in quanto danno la stessa reazione cromatica dei fosfati.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Pipetta da 100 mL tarata.
- Spettrofotometro o colorimetro con vaschette con cammino ottico da 1 cm (o superiore a seconda delle esigenze) adatto per misure intorno a 710 nm e comunque non inferiore a 650 nm. Con uno spettrofotometro che consenta misure a 885 nm si può ottenere un notevole aumento della sensibilità.

1.4. Reattivi

Tutti i reagenti debbono essere puri per analisi e l'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

Soluzione di molibdato di ammonio. Sciogliere 15 g di eptamolibdato (VI) di esammonio tetraidrato [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$] in 500 mL di acqua. La soluzione conservata in bottiglie di polietilene fuori del contatto della luce, è stabile per molti mesi.

Soluzione di acido solforico. Versare cautamente e sotto raffreddamento 140 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84) in 900 mL di acqua. Una volta raffreddata conservare la soluzione in bottiglie di vetro.

Soluzione di acido ascorbico. Sciogliere 27 g di acido ascorbico [$C_6H_80_6$] in 500 mL di acqua. Conservare la soluzione in bottiglie di polietilene ed in frigorifero. In tal modo è stabile per molti mesi. Non si può mantenere la soluzione alla temperatura ambiente per più di due o tre giorni.

Soluzione di tartrato di ossido di antimonio e potassio. Sciogliere 0,34 g di tartrato di ossido di antimonio(III) e di potassio emiidrato [$(K(SbO)C_4H_4O_6)_2 \cdot H_2O$] in 250 mL di acqua, scaldando se necessario. La soluzione, conservata in bottiglie di vetro o di plastica, è stabile per molti mesi.

Reagente misto. Mescolare 100 mL della soluzione di molibdato di ammonio con 250 mL di soluzione di acido solforico, 100 mL di soluzione di acido ascorbico e 50 mL di soluzione di tartrato di antimonio e potassio. Il reagente, preparato al momento dell'uso, non può essere conservato per più di 6 ore.

Soluzione standard concentrata di fosforo (1 mL = 0,1 mg di P). Sciogliere con acqua 0,4393 g di diidrogenofosfato di potassio anidro [KH_2PO_4], seccato a 105°C, e diluire con acqua a 1.000 mL in matraccio tarato. Conservare la soluzione in bottiglia scura, previa aggiunta di 1 mL di cloroformio. La soluzione è stabile per molti mesi.

Soluzione standard diluita di fosforo (1 mL = 0,001 mg di P). Prelevare 10 mL della soluzione standard di fosforo concentrata e diluire a 1.000 mL con acqua in matraccio tarato.

1.5. Procedimento

1.5.1. Calibrazione

In una serie di 7 beute da 250 mL introdurre rispettivamente 0; 3; 5; 10; 15; 20; 30 mL della soluzione standard diluita di fosforo, e portare a volume di 100 mL mediante aggiunta di acqua prelevata con apposita buretta. Aggiungere 10 mL di reagente misto, mescolando contemporaneamente. Dopo 10 minuti leggere l'assorbanza rispetto al bianco.
Costruire il grafico di taratura ponendo in ordinata le assorbanze ed in ascissa le corrispondenti quantità di fosforo presenti nei 100 mL.

1.5.2. Dosaggio del campione

Introdurre, mediante pipetta tarata, 100 mL di campione in una beuta da 250 mL. Aggiungere 10 mL di reagente misto e mescolare. Dopo 10 minuti e non oltre 15 minuti l'aggiunta del reattivo, a non meno di 20 °C, eseguire la misura di assorbanza della soluzione rispetto al bianco.
L'assorbanza del bianco non deve superare 0,005. Qualora si trovino valori di bianco troppo alti, controllare i reattivi e in particolare la soluzione di molibdato di ammonio.
È preferibile eseguire la curva di calibrazione e le letture a 885 nm. Qualora si esegua la misura intorno a 710 nm, si avrà una certa perdita di sensibilità che può essere compensata impiegando vaschette con cammino ottico di 5 cm.

1.6. Espressione dei risultati

Il contenuto di fosforo nel campione, presente come ortofosfato, ed espresso in mg L^{-1} è dato dalla seguente espressione:

$$P(\text{mg } L^{-1}) = P_t \bullet 10$$

dove P_t è la quantità di fosforo ricavata dal grafico di calibrazione.

1.7. Precisione ed accuratezza

La precisione, per misure spettrofotometriche a 885 nm ed espressa come deviazione standard in mg L^{-1}, è 0,01, a livello di concentrazione di 0,03 mg L^{-1}, mentre è di 0,018 a livello di concentrazione di 0,3.

2. Determinazione colorimetrica (fosforo totale)

2.1. Principio del metodo

Il metodo si basa su una preliminare trasformazione di tutti i composti del fosforo, organici ed inorganici, a ortofosfati mediante mineralizzazione acida con persolfato di potassio. Eventuali fosfati di metalli pesanti presenti in composti particolarmente resistenti all'attacco dei reagenti potrebbero non essere solubilizzati.
Gli ioni ortofosfato vengono quindi fatti reagire con il molibdato d'ammonio ed il tartrato di antimonio e potassio, in ambiente acido, in modo da formare un eteropoliacido che viene ridotto a blu di molibdeno, intensamente colorato.

Il metodo è applicabile a campioni di acque naturali, incluse le acque di mare, nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,06 e 0,6 mg L^{-1}, per un'aliquota di 50 mL di acqua in esame. Per concentrazioni più elevate occorre diluire opportunamente il campione. Per campioni a concentrazione fino a 5 volte inferiore a 0,06 mg L^{-1} occorre impiegare vaschette con cammino ottico maggiore di 1 cm ed effettuare la taratura con standard opportunamente diluiti.

2.2. Interferenze e cause di errore

Nella soluzione in cui viene misurata l'assorbanza, il Cu(II) ed il Fe(III) non interferiscono, se presenti in quantità inferiori rispettivamente a 10 e 50 mg L^{-1}; il Cr(VI) dà interferenza negativa pari al 3%, se presente in concentrazione superiore ad 1 mg L^{-1} ed al 10÷15%, se superiore a 10 mg L^{-1}; composti del silicio possono interferire: 20 mg L^{-1} di SiO_2 corrispondono a circa 0,005 mg L^{-1} di P; i nitrati non interagiscono se presenti in concentrazione inferiore a 100 mg L^{-1}; gli arseniati interferiscono in quanto danno la stessa reazione cromatica dei fosfati.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Cilindri graduati da 100 mL con tappo a smeriglio, oppure matracci tarati a doppia tacca a 100 e 110 mL, oppure matracci tarati a 100 mL muniti di bolla da almeno 10 mL, al di sopra della tacca.
- Spettrofotometro o colorimetro con vaschette con cammino ottico da 1 cm (o superiore a seconda delle esigenze) adatto per misure intorno a 710 nm e comunque non inferiore a 650 nm. Con uno spettrofotometro che consenta misure a 885 nm si può ottenere un notevole aumento della sensibilità.
- Beute pyrex da 250 mL con tappo a vite e guarnizione di politetrafluotoetilene (teflon).
- Autoclave o stufa termostatata.
- Centrifuga.

2.4. Reattivi

Tutti i reagenti debbono essere puri per analisi e l'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

Soluzione di molibdato di ammonio. Sciogliere 15 g di eptamolibdato(VI) di esammonio tetraidrato [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$•$4H_2O$] in 500 mL di acqua. La soluzione, conservata in bottiglia di polietilene fuori del contatto con la luce, è stabile per molti mesi.

Soluzione di acido solforico. Versare cautamente e sotto raffreddamento 140 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84) in 900 mL di acqua. Una volta raffreddata, la soluzione viene conservata in bottiglie di vetro.

Soluzione di acido ascorbico. Sciogliere 27 g di acido ascorbico [$C_6H_8O_6$] in 500 mL di acqua. Conservare la soluzione in bottiglie di plastica ed in frigorifero quando non è utilizzata. In tal modo è stabile per molti mesi. La soluzione non può essere mantenuta alla temperatura ambiente per più di due o tre giorni.

Soluzione di tartrato di antimonio e potassio. Sciogliere 0,34 g di tartrato di ossido di antimonio(III) e di potassio emiidrato [$(K(SbO)C_4H_4O_6)_2$•H_2O in 250 mL di acqua, scaldando se necessario. La soluzione, conservata in bottiglie di vetro o di plastica, è stabile per molti mesi.

Reagente misto. Mescolare 100 mL della soluzione di molibdato di ammonio con 250 mL di acido solforico, 100 mL di acido ascorbico e 50 mL di tartrato di antimonio e potassio. Il reagente, preparato al momento dell'uso, non può essere conservato per più di 6 ore.

Soluzione standard concentrata di fosforo (1 mL = 0,1 mg P). Sciogliere con acqua 0,4393 g di diidrogenofosfato di potassio anidro (KH_2PO_4), seccato a 105°C, e diluire con acqua a 1.000 mL in matraccio tarato. Conservare la soluzione in bottiglia scura, previa aggiunta di 1 mL di cloroformio. La soluzione è stabile per molti mesi.

Soluzione standard diluita di fosforo (1 mL = 0,001 mg P). Prelevare 10 mL della soluzione standard di fosforo concentrata e diluire a 1.000 mL con acqua in matraccio tarato.

Soluzione di acido solforico 10 M. Aggiungere a 40 mL di acqua 55 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84), cautamente e sotto raffreddamento, e portare al volume di 100 mL con acqua. Si conserva in bottiglia di vetro.
Soluzione di acido solforico 5 M. Diluire con un ugual volume di acqua la soluzione di acido solforico 10 M.
Soluzione di idrossido di sodio 2 M. Sciogliere 8 g di NaOH in 100 mL di acqua. La soluzione deve essere conservata in bottiglia di plastica.
Persolfato di potassio. Perossodisolfato di dipotassio [$K_2S_2O_8$] solido.
Soluzione di fenolftaleina. Sciogliere 0,5 g di fenolftaleina in una miscela di 50 mL di etanolo e 50 mL di acqua.

2.5. Procedimento

2.5.1. Taratura

In una serie di 7 beute con tappo a vite introdurre rispettivamente 0; 3; 5; 10; 15; 20; 30 mL della soluzione standard diluita di fosforo, e portare a volume di 50 mL mediante aggiunta di acqua prelevata con apposita buretta. Aggiungere una goccia di fenolftaleina e aggiustare il pH del campione al limite inferiore del viraggio dell'indicatore mediante la soluzione di acido solforico 5 M e di idrossido di sodio 2 M. Quindi addizionare 1 mL di acido solforico 10 M e 0,4 g di persolfato di potassio. Tappare e trasferire le beute in autoclave a 120°C per 30 minuti o in stufa termostatata a 95÷100°C per 2 ore. Lasciare raffreddare e trasportare quantitativamente la soluzione in un cilindro graduato da 100 mL, munito di tappo a smeriglio (o meglio in un matraccio tarato a doppia tacca o munito di bolla al di sopra della tacca). Aggiungere una goccia di fenolftaleina e idrossido di sodio 2 M fino a leggera colorazione rosa e diluire con acqua al volume di 100 mL. Aggiungere 10 mL di reagente misto, mescolando contemporaneamente. Se la soluzione resta torbida occorre centrifugare fino a renderla limpida. Dopo 10 minuti a non di meno di 20°C, eseguire la misura dell'assorbanza a 885 nm della soluzione rispetto al bianco. Qualora si esegua la misura intorno a 710 nm, si avrà una certa perdita di sensibilità che può essere compensata impiegando vaschette con cammino ottico di 5 cm.
Costruire il grafico di taratura ponendo in ordinata le assorbanze ed in ascissa le corrispondenti quantità di fosforo presenti nei 100 mL.

2.5.2. Dosaggio del campione

Omogeneizzare il campione, e prelevarne esattamente 50 mL. Per concentrazioni elevate prelevare un'aliquota di campione V, inferiore a 50 mL, e diluire con acqua ad un volume V_x opportuno e prelevarne 50 mL.
Introdurre nella beuta pyrex con tappo a vite i 50 mL. Aggiungere una goccia di fenolftaleina e aggiustare il pH del campione al limite inferiore del viraggio dell'indicatore mediante la soluzione di acido solforico 5 M e di idrossido di sodio 2 M. Quindi addizionare 1 mL di acido solforico 10 M e 0,4 g di persolfato di potassio. Tappare e trasferire la beuta in autoclave a 120°C per 30 minuti o in stufa termostatata a 95÷100°C per 2 ore. Lasciare raffreddare e trasportare quantitativamente la soluzione in un cilindro graduato da 100 mL, munito di tappo a smeriglio (o meglio in un matraccio tarato a doppia tacca o munito di bolla al di sopra della tacca). Aggiungere una goccia di fenolftaleina e idrossido di sodio 2 M fino a leggera colorazione rosa e diluire con acqua al volume di 100 mL. Aggiungere 10 mL di reagente misto, mescolando contemporaneamente. Se la soluzione resta torbida occorre centrifugare fino a renderla limpida. Dopo 10 minuti a non di meno di 20°C, eseguire la misura dell'assorbanza a 885 nm della soluzione rispetto al bianco. Qualora si esegua la misura intorno a 710 nm, si avrà una certa perdita di sensibilità che può essere compensata impiegando vaschette con cammino ottico di 5 cm.
Per la valutazione del bianco dei reattivi al posto del campione prelevare 50 mL di acqua. Qualora si trovino valori di bianco troppo alti, controllare i reattivi e in particolare la soluzione di molibdato di ammonio.

2.6. Espressione dei risultati

Per il calcolo del contenuto di fosforo totale nel campione, espresso in mg L^{-1}, utilizzare l'espressione:

$$P(\text{mg } L^{-1}) = \frac{P_t \cdot V_x \cdot 20}{V}$$

dove:

P_t = quantità di fosforo ricavato dal grafico di taratura;
V_x = volume in mL al quale si è diluito eventualmente il campione;
V = volume in mL dell'aliquota prelevata.

Se il campione non è stato preliminarmente diluito $V_x = V$.

2.7. Precisione ed accuratezza

Su campioni di acque naturali a concentrazioni comprese tra 20 e 100 µg L^{-1} si sono ottenuti valori di deviazione standard relativa intorno al 5%. Sugli stessi campioni sono state effettuate prove di recupero di aggiunte standard ottenendo rese superiori al 98%.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

MAGNESIO

1. Determinazione per assorbimento atomico

1.1. Principio del metodo

Il magnesio viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 285,2 nm.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, di scarico e di mare per concentrazioni comprese fra 0,05 e 5 mg L^{-1} di Mg. Concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo opportunamente il campione. Nel caso in cui le concentrazioni da determinare siano notevolmente basse si ricorrerà al metodo delle aggiunte.
Per acque ad elevata salinità, dopo opportune diluizioni, si ricorrerà al metodo delle aggiunte per evitare interferenze o errori.

1.2. Interferenze e cause di errore

L'interferenza del fosfato nella determinazione del magnesio viene eliminata con l'aggiunta di sali di lantanio.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore per aria-acetilene e di tutti gli accessori necessari.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua distillata e deionizzata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Soluzione di lantanio (10% La). Sciogliere 117,276 g di ossido di lantanio [La_2O_3] in poca acqua, aggiungere 250 mL di acido cloridrico concentrato e portare a volume di 1.000 mL con acqua.
Acido cloridrico (1+99). Aggiungere un volume di HCl concentrato a 99 volumi di acqua.
Soluzione standard di magnesio (1mL = 1 mg di Mg). Sciogliere 1 g di magnesio metallico nel minimo volume di HCl (1+1) e diluire a 1.000 mL con HCl (1+99).

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio ed alla fine di ogni ciclo di analisi.
Preparare 4 soluzioni di taratura tali che la concentrazione di magnesio nel campione risulti compresa tra i loro valori. A tale scopo in 4 matracci da 100 mL diluire opportunamente la soluzione standard di magnesio, curando di aggiungere 10 mL di soluzione di lantanio e 1 mL di HCl concentrato; portare a volume di 100 mL con acqua. Preparare anche un bianco diluendo 10 mL della soluzione di lantanio e 1 mL di HCl concentrato; portare a volume di 100 mL con acqua. Aspirare le soluzioni e tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni in mg L^{-1} e in ordinata le assorbanze corrette del valore del bianco.

1.5.2. Determinazione

1.5.2.1. Analisi del campione

A 80 mL di campione (o a un'aliquota diluita) aggiungere 1 mL di HCl concentrato, 10 mL di soluzione di lantanio e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato con acqua. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare la soluzione e il bianco, effettuare le letture di assorbanza e sottrarre il valore del bianco da quello della soluzione. Riportare il valore di assorbanza sul grafico di taratura e determinare la concentrazione corrispondente.

1.5.2.2. Metodo delle aggiunte

Preparare 4 aliquote di campione (eventualmente diluito) da 80 mL; a tre di esse aggiungere volumi (fino ad un massimo di 9 mL) di soluzione standard tali da ottenere concentrazioni diverse che comprendano nel loro intervallo la concentrazione incognita da determinare e alla quarta aliquota addizionare 9 mL di acido cloridrico 1+99. Aggiungere poi 1 mL di HCl concentrato, 10 mL di soluzione di lantanio e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare le soluzioni ed il bianco, effettuare le letture di assorbanza, quindi sottrarre il valore del bianco da quello delle soluzioni. Riportare in un grafico sull'asse delle ordinate i valori di assorbanza ottenuti e in ascissa i valori di concentrazione delle soluzioni ottenuti dopo le aggiunte standard. La retta passante per i punti così individuati incontra l'asse delle ascisse in un punto (di valore negativo sul grafico) corrispondente alla concentrazione di magnesio del campione in esame.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurato, la concentrazione di Mg^{++} espressa in mg L^{-1} è data da:

$$Mg\ (mg\ L^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V}$$

dove:

- a = concentrazione di magnesio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
- V = volume di campione (in mL) usato;
- 100 = volume della soluzione aspirata.

La concentrazione di Mg^{++} espressa in meq L^{-1} è data da:

$$Mg\ (mg\ L^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V \cdot 12{,}15}$$

dove:

- a = concentrazione di magnesio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
- V = volume di campione (in mL) usato;
- 100 = volume della soluzione aspirata;
- 12,15 = peso equivalente del magnesio.

1.7. Precisione ed accuratezza

La deviazione standard determinata su un campione avente un valore medio misurato di 0,46 mg L^{-1} è risultata ±0,02 mg L^{-1}. Su un campione contenente 0,46 mg L^{-1} si sono ottenuti recuperi quantitativi.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

MANGANESE

1. Determinazione per assorbimento atomico (acque dolci)

1.1. Principio del metodo

Il manganese viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 279,5 nm.
Questo metodo consente la determinazione del manganese, disciolto o solubilizzabile in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,02 a 5 mg L^{-1} di Mn. L'intervallo che fornisce i risultati più attendibili è compreso tra 0,2 e 5 mg L^{-1}. Per concentrazioni superiori a 5 mg L^{-1} è possibile rientrare in detto intervallo ricorrendo alla diluizione del campione.

1.2. Interferenze e cause di errore

Nessuna interferenza proviene dalla silice, purché la sua concentrazione sia inferiore a 100 mg L^{-1}. Se la concentrazione di silice supera i 100 mg L^{-1}, l'interferenza può essere eliminata ricorrendo all'aggiunta di sali di calcio.

1.3. Apparecchiature

Il lavaggio della vetreria deve essere fatto con acido nitrico diluito caldo e abbondanti risciacqui con acqua

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato possibilmente di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di bruciatore standard per aria-acetilene e di tutti gli altri accessori necessari.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere deionizzata e distillata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).
Acido nitrico diluito (1+199). Aggiungere 1 volume di HNO_3 concentrato a 199 volumi di acqua.
Soluzione standard concentrata di manganese (1 mL = 1 mg di Mn). Sciogliere 3,076 g di solfato di manganese(II) monoidrato [$MnSO_4 \cdot H_2O$] in una soluzione contenente 10 mL di HNO_3 concentrato e 100 mL di acqua; diluire a 1.000 mL con acqua.
Soluzione standard diluita di manganese (1 mL = 0,1 mg di Mn). Diluire 100 mL della soluzione concentrata di Mn e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.
Soluzione standard molto diluita di manganese (1 mL = 0,01 mg di Mn). Diluire 100 mL della soluzione diluita di manganese e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura per la determinazione del manganese disciolto
È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio e alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente, la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico 1+199 e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico 1+199 (bianco). La concentrazione di manganese nel campione deve essere compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni di manganese, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.2. Taratura per la determinazione del manganese dopo trattamento con acido cloridrico
È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio e alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente, la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico 1+199 e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico 1+199 (bianco). La concentrazione di manganese nel campione deve essere compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido cloridrico concentrato. Evaporare fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare le soluzioni ed il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura, aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni di manganese, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.3. Taratura per la determinazione del manganese dopo trattamento ripetuto con acido nitrico
È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio e alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente, la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico 1+199 e in un altro beaker acido nitrico 1+199 (bianco). La concentrazione di manganese nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare i beaker e aggiungere altri 5 mL di acido nitrico. Coprire i beaker con vetrini da orologio e ripetere il trattamento lo stesso numero di volte necessario per ottenere la digestione completa del campione (ciò è indicato da un residuo debolmente colorato). Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti dei beaker ed i vetrini da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matracci tarati. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare la lettura delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni del manganese in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti dal valore del bianco.

1.5.4. Determinazione del manganese disciolto
Porre in un beaker 100 mL di campione, filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 µm, a cui sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro, e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). Aspirare il campione ed il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi.

1.5.5. Determinazione del manganese dopo trattamento con acido cloridrico
Porre in un beaker 100 mL di campione, filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 µm, a cui sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro, e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco).
Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido cloridrico concentrato. Evaporare fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare il campione e il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura, aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi.

1.5.6. Determinazione del manganese dopo trattamento ripetuto con acido nitrico

Porre in un beaker 100 mL di campione, filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 µm, a cui sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro, e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco).

Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare i beaker e aggiungere altri 5 mL di acido nitrico. Coprire i beaker con vetrini da orologio e ripetere il trattamento lo stesso numero di volte necessario per ottenere la digestione completa del campione (ciò e indicato da un residuo debolmente colorato). Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti dei beaker e i vetrini da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matracci tarati. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare la lettura delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per 10÷15 secondi.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurato e corretto del valore del bianco, attraverso l'opportuna curva di taratura, si risale alla concentrazione di manganese nel campione in esame espressa in mg L^{-1}.

1.7. Precisione ed accuratezza

Prove effettuate da tre differenti laboratori su campioni di acque di scarico prima e dopo aggiunta di quantità note di manganese (in modo da ottenere campioni con concentrazione di circa 2 mg L^{-1}) hanno dato valori della deviazione standard relativa compresi tra 0,7 e 1,7%, e recuperi relativi delle quantità aggiunte compresi tra il 93 e il 100%.

2. Determinazione colorimetrica (acque marine e salmastre)

2.1. Principio del metodo

Il manganese, in ambiente alcalino, dà un prodotto di colore bruno rossiccio con la formaldossima [H_2C=NOH]. Il composto sembra essere [$(CH_2NO)_3Mn$] (con il metallo allo stato III). Lo stesso complesso si ottiene con il manganese II e IV. Il complesso si forma a pH 10,5 in presenza di citrato. Il campione viene successivamente riscaldato a 80 °C per decomporre gli altri complessi metallo-formaldossima. Infine il manganese totale viene determinato per colorimetria dopo ossidazione con persolfato.

Il manganese in concentrazioni di pochi mg L^{-1} può essere determinato in vaschette da 10 cm di cammino ottico. La curva standard ha un andamento lineare fino a parecchi mg L^{-1}.

2.2. Interferenze e cause di errore

Variazioni di salinità non hanno effetto. Il metodo può essere applicato anche a campioni che contengono parecchi mg L^{-1} di H_2S.

Anche Fe, Ni, Co e Cu formano complessi colorati con la formaldossima. Riscaldando ad 80°C il chelato di Cu viene completamente distrutto e quelli di Ni e Co decolorati al 95, 98% rispettivamente. Per quanto riguarda il ferro, al di sopra di 1 mg L^{-1}, ogni 100 µg equivalgono a 0,015 µg di Mn. Tra 1 e 10 mg L^{-1} di ferro, ogni milligrammo equivale a 0,02 µg L^{-1} di manganese.

2.3. Attrezzature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Beute tarate da 50 mL.
- Mantelli elettrici riscaldanti fino a 80°C muniti di termometro per controllare la temperatura.
- Contenitori da 50 mL in vetro, polipropilene, policarbonato o teflon con tappo a vite di polipropilene.
- Autoclave o pentola a pressione in acciaio.
- Spettrofotometro predisposto per vaschette da 10 cm di cammino ottico.

2.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere distillata o deionizzata. Tutti i rettivi devono essere conservati in bottiglie di plastica o di PVC.

Soluzione di acido solforico 4,5 M. Aggiungere cautamente 250 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84) a 750 mL di acqua. Lasciare raffreddare e diluire a 1.000 mL.

Soluzione di idrossido di sodio 2 M. Disciogliere 80 g di idrossido di sodio [NaOH] in acqua e diluire a 1.000 mL.

Soluzione satura di citrato di sodio. Disciogliere il citrato trisodico biidrato [$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$] nella proporzione di 24 g di sale in 40 mL di acqua. La soluzione è stabile.

Soluzione di formaldossima. Disciogliere 10 g di cloridrato di idrossilammina [$NH_2OH \cdot HCl$]) in circa 80 mL di acqua e aggiungere 5 mL di soluzione di formaldeide al 35% [HCHO] (d = 1,08). Diluire a 100 mL con acqua. Il reattivo, se conservato al buio, è stabile per mesi.

Soluzione di persolfato di potassio. Disciogliere 5 g di perossidisolfato di potassio [$K_2S_2O_8$] in 100 mL di acqua. Conservare questa soluzione satura a temperatura ambiente al riparo dai raggi diretti del sole. Il reattivo è stabile per almeno due settimane.

Soluzione standard di manganese (1 mL = 0,1 mg di Mn). Disciogliere 30,8 mg di solfato manganoso monoidrato [$MnSO_4 \cdot H_2O$] in acqua contenente 0,2 mL di acido solforico 4,5 M e diluire a 100 mL. È anche possibile fare ricorso a standard già pronti o da diluire. Lo standard di lavoro deve essere preparato giornalmente per diluizione con acqua.

2.5. Procedimento

2.5.1. Taratura

Diluire la soluzione standard di manganese fino a 50 mg L^{-1}. Operare con almeno tre porzioni da 50 mL (utilizzando i contenitori da 50 mL). A 50 mL di standard (50 mg L^{-1} di Mn) addizionare 1 mL di soluzione di citrato, 1 mL di soluzione di formaldossima e 0,8 mL di soluzione di idrossido di sodio. Mescolare bene tra un'aggiunta e l'altra. Porre un termometro nella soluzione e riscaldare il contenitore a 79÷80°C per 5 minuti servendosi di un mantello elettrico riscaldante. Al di sopra di 80°C il complesso contenente il manganese inizia a decomporsi. Togliere il contenitore dal mantello e lasciar raffreddare per 15 minuti. Ripetere la stessa procedura con almeno tre porzioni da 50 mL di acqua per la determinazione del bianco. Misurare l'assorbanza entro 30 minuti a 450 nm in celle da 10 cm di cammino ottico usando acqua come riferimento. Calcolare il fattore con l'espressione:

$$F = \frac{50}{A_{st}-A_b}$$

dove A_{st}-A_b sono rispettivamente le medie delle assorbanze degli standard e del bianco.

Il fattore F deve essere compreso tra 500 e 550. Il fattore F deve essere controllato quando almeno un reattivo viene rinnovato.

Per la determinazione del manganese totale, è opportuno operare con 40 mL di soluzione al fine di far uso degli stessi contenitori da 50 mL. Dopo l'ossidazione e aggiunta dei reagenti la soluzione va diluita a 50 mL. In questo caso il fattore F deve essere moltiplicato per 1,19.

2.5.2. Bianco reagenti

A 50 mL di acqua aggiungere 1 mL di soluzione di citrato, 1 mL di soluzione di formaldossima e 0,8 mL di soluzione di idrossido di sodio. Mescolare bene tra un'aggiunta e l'altra. Porre un termometro nella soluzione e riscaldare il contenitore a 79÷80°C per 5 minuti servendosi di un mantello elettrico riscaldante. Togliere il contenitore dal mantello e lasciar raffreddare per 15 minuti. Misurare l'assor-

banza (A_b) entro 30 minuti a 450 nm in celle da 10 cm di cammino ottico usando acqua come riferimento.
A 47 mL di acqua aggiungere 2 mL di soluzione di citrato, 2 mL di soluzione di formaldossima e 1,6 mL di soluzione di idrossido di sodio. Mescolare bene tra un'aggiunta e l'altra. Porre un termometro nella soluzione e riscaldare il contenitore a 79÷80°C per 5 minuti servendosi di un mantello elettrico riscaldante. Togliere il contenitore dal mantello e lasciar raffreddare per 15 minuti. Misurare l'assorbanza (A_{2b}) entro 30 minuti a 450 nm in celle da 10 cm di cammino ottico usando acqua come riferimento.

$$A_{rb} = A_{2b} - A_b$$

A_{rb} deve assumere un valore numerico compreso tra 0,005 e 0,01 in celle da 10 cm di cammino ottico.
Il bianco reagenti per il manganese totale viene determinato in modo similare usando 40 mL e 30 mL di acqua rispettivamente. Dopo l'ossidazione la soluzione viene diluita a 50 mL.
In questo caso A_{rb} deve risultare pari a circa 0,040 sempre in celle da 10 cm.

2.5.3. Determinazione del manganese reattivo
Questa determinazione deve essere condotta il più presto possibile, dopo il campionamento, preferibilmente entro un'ora.
A 50 mL di campione non previamente acidificato collocati nell'apposito contenitore aggiungere 1 mL di soluzione di citrato di sodio, 1 mL di reagente formaldossina e 0,8 mL di soluzione di idrossido di sodio; mescolare tra un'aggiunta e l'altra. Riscaldare ad 79÷80°C e successivamente lasciar raffreddare come per gli standard. Misurare l'assorbanza (A_s) in celle da 10 cm di cammino ottico a 450 nm entro un'ora usando acqua come riferimento. Versare nuovamente il contenuto della cuvetta nel contenitore da 50 mL, aggiungere 0,4 mL di acido solforico per distruggere il complesso con il manganese. Per misurare la torbidità e/o il colore del campione leggere l'assorbanza del campione acidificato (A_{ct}) in celle da 10 cm di cammino ottico a 450 nm entro un'ora usando acqua come riferimento.
Se il campione era stato previamente acidificato con 0,2 mL di acido solforico, l'aggiunta di idrossido di sodio deve essere pari a 1,3 mL e non a 0,8 mL. In questo caso la determinazione può anche includere il manganese rilasciato da complessi deboli.

2.5.4. Determinazione del manganese totale
A 40 mL di campione acidificato, collocati nell'apposito contenitore, aggiungere 4 mL di soluzione di persolfato di potassio. Chiudere il contenitore in autoclave o pentola a pressione, riscaldare per 30 minuti a 115°C. Dopo raffreddamento trasferire il contenuto nel contenitore adatto e aggiungere 1 mL di soluzione di citrato, 1 mL di reagente formaldossima e 2 mL di idrossido di sodio e diluire a 50 mL con acqua. Proseguire poi come per il manganese reattivo. In questo caso la misura del colore e/o torbidità può essere trascurata.

2.6. Espressione dei risultati
2.6.1. Manganese reattivo
La concentrazione del manganese reattivo, espressa in $\mu g\ L^{-1}$ è data da:

$$Mn\ (\mu g\ L^{-1}) = F \bullet (A_s - A_{ct} - A_{rb})$$

dove:

F = fattore di taratura per le celle usate;
A_s = assorbanza del campione;
A_{ct} = torbidità (assorbanza del campione acidificato;
A_{rb} = bianco dei reagenti.

2.6.2. Manganese totale

La concentrazione del manganese totale, espressa in $\mu g\ L^{-1}$ è data da:

$$Mn\ (\mu g\ L^{-1}) = F \bullet (A_s - A_{H_2O} - A_{rb})$$

dove:

F	=	fattore di taratura per le celle usate;
A_s	=	assorbanza del campione;
A_{H_2O}	=	assorbanza della cella riempita di acqua;
A_{rb}	=	bianco dei reagenti.

2.7. Precisione ed accuratezza

La riproducibilità del metodo è migliore del 10%; ai livelli bassi può essere anche doppia.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

GRASSHOFF K., EHRHARDT M. KREMLING K. (1983), *Methods of Seawater Analysis*, II Ed. Verlag. Chemie.

MOLIBDENO

1. Determinazione per assorbimento atomico (bassi livelli)

1.1. Principio del metodo
Il metodo si basa sulla determinazione diretta del molibdeno mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornetto di grafite. L'assorbanza viene letta alla lunghezza d'onda di 313,3 nm.
Il metodo consente la determinaziome del molibdeno nell'intervallo di concentrazione da 3 a 60 μg L^{-1} con limite di rivelabilità pari a 1 μg L^{-1}. Concentrazioni più elevate possono essere determinate aumentando il flusso di gas in fase di atomizzazione e/o riducendo il volume di campione iniettato.

1.2. Interferenze e cause di errore
Interferenze o cause di errore, non specifiche per il molibdeno, sono quelle inerenti il sistema di atomizzazione senza fiamma. In particolare è necessario che l'apparecchio sia corredato di correttore del fondo (lampada al deuterio o Zeemen).

1.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico corredato di correttore di fondo, di lampada a catodo cavo (HCL) specifica, di fornetto di grafite, di campionatore automatico e di tutti gli accessori necessari.
- Tubi di grafite pirolitica.

1.4. Reattivi
I reattivi devono essere ad alto grado di purezza. L'acqua distillata o deionizzata di tipo commerciale deve essere ulteriormente purificata (ECw ≤ 0,1 μS cm^{-1}).
Soluzione di acido nitrico concentrato [HNO_3] (d =1,42).
Soluzione di acido nitrico (1+1). Aggiungere un volume di acido nitrico concentrato ad un volume di acqua.
Soluzione di acido nitrico diluito. Diluire 1,5 mL di acido nitrico concentrato a 1.000 mL con acqua.
Soluzione standard di molibdeno (1 mL = 0,1 mg Mo). Disciogliere 0.2043 g di molibdato ammonico [$(NH_4)_2MoO_4$] in HNO_3 diluito e diluire a 1.000 mL sempre con HNO_3 diluito.

1.5. Procedimento
1.5.1. Taratura
Preparare giornalmente gli standard per la taratura dello strumento diluendo la soluzione standard di molibdeno. Preparare un bianco e almeno una sequenza di tre standard in un appropriato intervallo di taratura (3÷60 μg L^{-1}), adattando l'acidità del bianco e delle soluzioni standard in modo che siano il più vicino possibile a quelle dei campioni. Iniettare nel fornetto di grafite adeguate aliquote di bianco e di soluzioni standard, eseguendo almeno tre letture per ogni soluzione per verificare la precisione del metodo. Costruire una retta con le medie dei picchi di assorbanza in ordinata contro le concentrazioni in ascissa.
Per acque con matrici complesse, usare il metodo delle aggiunte standard.

1.5.2. Preparazione del campione
1.5.2.1. Molibdeno solubile
Filtrare il campione al momento del campionamento su filtri da 0,45 μm in policarbonato o acetato di cellulosa. Previamente filtrare un bianco consistente in acqua deionizzata per controllare la quantità di

molibdeno eventualmente rilasciata dal filtro. Precondizionare il filtro e l'apparato filtrante con 50 mL di acqua deionizzata. Se il bianco contiene quantità significative di argento, immergere il filtro in HNO_3 (1+1) e risciacquare con acqua deionizzata prima dell'uso. Da sottolineare che differenti filtri mostrano differenti caratteristiche di assorbimento e di filtrazione e pertanto, per le analisi in tracce, testare previamente i filtri per verificare il completo recupero del metallo. Prima della filtrazione, se il campione è fortemente torbido, sottoporlo a centrifugazione e quindi filtrarlo e successivamente acidificarlo fino a pH 2 con HNO_3 concentrato. Se l'acidificazione forma un precipitato, sottoporre a digestione il filtrato come indicato in 1.5.2.2.

1.5.2.2. Molibdeno totale

Trasferirne 50 o 100 mL in una beuta o in un beaker, aggiungere 5 mL di HNO_3 concentrato ed alcune palline di vetro per controllare l'ebollizione. Portare a lenta ebollizione ed evaporare su piastra riscaldante fino al più piccolo volume possibile (10÷20 mL), prima che si produca un precipitato. Continuare a riscaldare, aggiungendo eventualmente altro HNO_3 concentrato fino a che la soluzione limpida indica che la digestione è completa. Trasferire integralmente la soluzione in un palloncino tarato da 100 mL.

1.5.3. Analisi del campione

Analizzare tutti i campioni, eccetto quelli che si dimostrano privi delle interferenze di matrice (basate sul recupero dell'85÷115% dello standard aggiunto) usando il metodo delle aggiunte standard.
Analizzare i campioni almeno in doppio o fino a che i risultati ottenuti siano riproducibili. Una riproducibilità ≤ 10% è da considerarsi accettabile.

1.5.3.1. Determinazione diretta

Iniettare un'aliquota "nota" di campione nel fornetto di grafite, iniettando lo stesso volume usato per la curva di calibrazione. Seccare, incenerire e atomizzare in accordo con il programma preselezionato. Ripetere fino alla riproducibilità dell'assorbanza. Confrontare il valore di assorbanza media o l'area di picco alla curva di calibrazione per determinare la concentrazione del molibdeno, altrimenti leggere direttamente la concentrazione se l'apparecchio è dotato di questa possibilità.
Se l'assorbanza (o la concentrazione) o l'area di picco del campione più concentrato è maggiore di quella dello standard, diluire il campione e ripetere l'analisi mantenendo l'acidificazione costante.

1.5.3.2. Metodo delle aggiunte standard

Impiegare il metodo delle aggiunte standard quando il metallo è contenuto in matrici complesse che possono produrre interferenze. Questo metodo è valido solo quando le assorbanze cadono nella porzione lineare della curva di calibrazione. Una volta che la sensibilità dello strumento è stata ottimizzata, si può procedere con l'analisi del campione.
Iniettare una aliquota "nota" di campione nel fornetto. Seccare, incenerire e atomizzare secondo il programma preselezionato. Ripetere fino a ottenere la riproducibilità del risultato. Registrare la risposta dello strumento in assorbanza o concentrazione. Aggiungere una concentrazione nota di molibdeno in una porzione separata di campione in modo da non cambiare significativamente il volume del campione e ripetere la lettura. Ripetere l'operazione con una aggiunta doppia di standard rispetto alla precedente e ripetere la lettura. Porre in un grafico le assorbanze in ordinata contro le concentrazioni aggiunte in ascissa. Tirare una retta che colleghi i tre punti ed estrapolare l'assorbanza "zero". L'intercetta sull'asse delle ascisse rappresenta la concentrazione del campione.

1.6. Espressione dei risultati

La concentrazione del molibdeno, espressa in $\mu g\ L^{-1}$, è data da:

$$Mo\ (\mu g\ L^{-1}) = C \cdot F$$

dove:

C = concentrazione del molibdeno letta sullo strumento o ricavata dalla curva di taratura ($\mu g\ L^{-1}$);
F = fattore di diluizione.

1.7. Precisione ed accuratezza

Non vengono riportate note su precisione e accuratezza.

2. Determinazione per assorbimento atomico (alti livelli)

2.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione diretta del molibdeno mediante spettrofotometria di assorbimento atomico in fiamma protossido d'azoto-acetilene. L'assorbanza viene letta alla lunghezza d'onda di 313,3 nm.

Il metodo consente la determinaziome del molibdeno nell'intervallo di concentrazione da 1 a 20 mg L^{-1} con limite di rivelabilità pari a 0.1 mg L^{-1}.

2.2. Interferenze e cause di errore

Interferenze o cause di errore, non specifiche per il molibdeno, sono quelle inerenti il sistema di atomizzazione in fiamma. In particolare è opportuno che l'apparecchio sia corredato di correttore del fondo (lampada al deuterio).

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico corredato di bruciatore protossido d'azoto-acetilene, correttore di fondo, lampada a catodo cavo (HCL) specifica e di tutti gli accessori necessari.

2.4. Reattivi

I reattivi devono essere di grado puro per analisi e l'acqua distillata o deionizzata.

Soluzione di acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Soluzione di acido nitrico (1+1). Aggiungere un volume di acqua ad un volume di acido nitrico concentrato.

Soluzione di acido nitrico diluito. Diluire 1,5 mL di acido nitrico concentrato a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard di molibdeno (1 mL = 0,1 mg di Mo). Disciogliere 0,2043 g di molibdato ammonico [$(NH_4)_2MoO_4$] in HNO_3 diluito e diluire a 1.000 mL sempre con HNO_3 diluito.

Soluzione di nitrato d'alluminio. Disciogliere 139 g di nitrato di alluminio [$Al(NO_3)_3 \cdot H_2O$] in 150 mL di acqua. Acidificare leggermente per impedire l'idrolisi e la precipitazione. Riscaldare per disciogliere completamente. Raffreddare e diluire a 200 mL.

2.5. Procedimento

2.5.1. Taratura

Preparare giornalmente gli standard per la taratura dello strumento diluendo la soluzione standard di molibdeno. Preparare almeno una sequenza di tre standard in un appropriato intervallo di taratura che comprenda l'assorbanza del campione, adattando l'acidità delle soluzioni standard in modo che siano più vicino possibile a quelle dei campioni.

Aggiungere a ciascuno standard la soluzione di nitrato d'alluminio in ragione di 2 mL per 100 mL.

Azzerare lo strumento con HNO_3 diluito e aspirare nel bruciatore le soluzioni per misurarne l'assorbanza. Costruire una retta con le assorbanze in ordinata contro le concentrazioni in ascissa.

2.5.2. Preparazione del campione

2.5.2.1. Molibdeno solubile

Filtrare il campione al momento del campionamento su filtri da 0,45 µm in policarbonato o acetato di cellulosa. Previamente filtrare un bianco consistente in acqua per controllare la quantità di molibdeno eventualmente rilasciata dal filtro. Precondizionare il filtro e l'apparato filtrante con 50 mL di acqua. Se il bianco contiene quantità significative di molibdeno, immergere il filtro in HNO_3 (1+1) e risciacquare con acqua prima dell'uso. Prima della filtrazione, se il campione è fortemente torbido, sottoporlo a centrifugazione e quindi filtrarlo e successivamente acidificarlo fino a pH 2 con HNO_3 concentrato. Se l'acidificazione forma un precipitato, sottoporre a digestione il filtrato come indicato in 2.5.2.2.

2.5.2.2. Molibdeno totale

Mescolare il campione e trasferirne 100 mL in una beuta o in un beaker da 100÷150 mL, aggiungere HNO_3 concentrato e alcune palline di vetro per controllare l'ebollizione. Portare a lenta ebollizione ed evaporare su piastra riscaldante fino al più basso volume possibile (10÷20 mL), prima che si produca un precipitato. Continuare a riscaldare, aggiungendo eventualmente altro HNO_3 concentrato fino a che la soluzione limpida indica che la digestione è completa. Trasferire integralmente la soluzione in un palloncino tarato da 100 mL.

2.5.3. Analisi del campione

Azzerare lo strumento con la soluzione di HNO_3 diluito e misurare l'assorbanza dopo aver aggiunto 2 mL di soluzione di nitrato d'alluminio per 100 mL di campione.

2.6. Espressione dei risultati

La concentrazione del molibdeno, espressa in mg L^{-1} è data da:

$$Mo\ (mg\ L^{-1}) = C \bullet F$$

dove:

C = concentrazione del molibdeno letta sullo strumento o ricavata dalla curva di taratura (mg L^{-1});

F = fattore di diluizione.

2.7. Precisione ed accuratezza

Con una concentrazione di 7,5 mg L^{-1} è stata ottenuta una deviazione standard relativa inferiore all'1%.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).

NICHEL

1. Determinazione per assorbimento atomico (acque dolci)

1.1. Principio del metodo

Il nichel viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 232,0 nm.
Il metodo consente la determinazione del nichel, disciolto o solubilizzabile nelle acque naturali e di scarico, nell'intervallo di concentrazione da 0,1 a 10 mg L^{-1} di Ni. L'intervallo che fornisce i risultati più attendibili è compreso tra 0,6 e 10 mg L^{-1}. Per concentrazioni superiori a 10 mg L^{-1} è possibile rientrare in detto intervallo ricorrendo alla diluizione del campione.

1.2. Interferenze e cause di errore

Sodio, potassio, solfati e cloruri (ciascuno a concentrazioni fino a 9 g L^{-1}) non interferiscono.
I nitrati non interferiscono se presenti a concentrazioni inferiori a 2 g L^{-1}.
Calcio, magnesio e ferro (ciascuno a concentrazioni fino a 4 g L^{-1}) non interferiscono.
Cadmio, piombo, rame, zinco, cobalto e cromo (fino a concentrazioni di 10 mg L^{-1} ciascuno) non interferiscono.

1.3. Apparecchiature

Tra i vari sistemi proponibili per il lavaggio della vetreria risulta conveniente quello che impiega acido nitrico diluito caldo. Comunque, qualunque sia la soluzione di lavaggio adottata, è necessario successivamente sciacquare abbondantemente con acqua deionizzata e distillata.

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato possibilmente di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di bruciatore standard per aria-acetilene e di tutti gli altri accessori necessari.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere deionizzata e distillata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).
Acido nitrico diluito (1+199). Aggiungere 1 volume di HNO_3 concentrato a 199 volumi di acqua.
Soluzione standard concentrata di nichel (1 mL = 1 mg di Ni). Sciogliere 4,953 g di nitrato di nichel(II) esaidrato [$Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$] in una soluzione contenente 10 mL di HNO_3 concentrato e 100 mL di acqua; diluire a 1.000 mL con acqua.
Soluzione standard diluita di Ni (1 mL = 0,1 mg di Ni). Diluire 100 mL della soluzione standard concentrata di Ni e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.
Soluzione standard molto diluita di Ni (1 mL = 0,01 mg di Ni). Diluire 100 mL della soluzione standard diluita di Ni e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

1.5. Procedimento

Eseguire le operazioni consigliate nel manuale d'istruzione dello strumento e selezionate la lunghezza d'onda di 232,0 nm.
È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio e alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente, la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.

1.5.1. Taratura per la determinazione del nichel disciolto
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di nichel nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni del nichel, espresse in mg L^{-1}, ed in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.2. Taratura per la determinazione del nichel dopo trattamento con acido cloridrico
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di nichel nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido cloridrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire le soluzioni in matracci da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura, aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciate il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni del nichel, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.3. Taratura per la determinazione del nichel dopo trattamento ripetuto con acido nitrico
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di nichel nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare i beaker e aggiungere altri 5 mL di acido nitrico concentrato. Coprire i beaker con vetrini da orologio e ripetere il trattamento lo stesso numero di volte necessarie per ottenere la digestione completa del campione (ciò è indicato da un residuo debolmente colorato). Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti dei beaker e i vetrini da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matracci tarati. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare la lettura delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni del nichel, espresse in mg L^{-1}, ed in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti dal valore del bianco.

1.5.4. Determinazione del nichel disciolto
Aggiungere al campione, filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 μm, 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro di campione.
Aspirare la soluzione e il bianco ed effettuare la lettura dell'assorbanza corretta del valore del bianco.

1.5.5. Determinazione del nichel dopo trattamento con acido cloridrico
Porre 100 mL di campione in un beaker ed aggiungere 5 mL di acido cloridrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare la soluzione e il bianco ed effettuare le lettute delle assorbanze.

1.5.6. Determinazione del nichel dopo trattamento ripetuto con acido nitrico
Porre 100 mL di campione in un beaker ed aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare il beaker e aggiungere altri 5 mL di acido nitrico concentrato. Coprire il beaker con vetrino da orologio e ripetere il trattamento fino a digestione completa del campione (ciò è indicato da un residuo debolmente colorato). Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti del beaker ed il vetrino da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matraccio tarato. Aspirare le soluzioni e il bianco ed effettuare la lettura delle assorbanze.

1.6. Espressione dei risultati
Dal valore di assorbanza misurato e corretto del valore del bianco, attraverso la curva di taratura, si risale alla concentrazione di nichel, espressa in mg L^{-1}, nel campione in esame.

1.7. Precisione ed accuratezza
Prove effettuate da cinque differenti laboratori su campioni di acque di scarico prima e dopo aggiunta di quantità note di nichel (in modo da ottenere campioni con concentrazione di circa 2 mg L^{-1}) hanno dato valori della deviazione standard relativa compresi tra 0,8 e 9%, e recuperi relativi delle quantità aggiunte del 100%.

2. Determinazione per assorbimento atomico (acque salate e/o marine)

2.1. Principio del metodo
Il metodo si basa sulla estrazione con un piccolo volume di metilisobutilchetone (MIBK) del complesso formato dal nichel con il sale di ammonio dell'acido-1-pirrolidinditiocarbossilico (APDC) allo scopo di concentrare il metallo e di eliminare le interferenze derivanti dalla matrice salina dell'acqua di mare. Complessazione ed estrazione sono possibili in un ampio intervallo di pH; ma si preferisce operare tra pH 4 e 5 per avere una resa ottimale ed una migliore stabilità del complesso.
Poiché l'efficienza di estrazione del complesso Ni-APDC e la solubilità del MIBK in acqua sono influenzate dalla salinità e dalla temperatura, è necessario che gli standard siano preparati impiegando la stessa matrice salina dei campioni e che, sia gli standard che i campioni, siano trattati ad una temperatura costante e quanto più possibile vicina a 20°C.
La fase organica viene aspirata direttamente nella fiamma aria/acetilene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 232,0 nm.
Il metodo può essere impiegato per determinare concentrazioni di nichel nell'intervallo 0,2÷10 µg L^{-1} nelle acque salate e marine.

2.2. Interferenze e cause di errore
Per il nichel non si riscontrano fenomeni di interferenza derivanti dalle specie chimiche presenti in acqua di mare.

2.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio. Per il prelievo di piccoli volumi nelle preparazioni degli standard è consigliabile l'impiego di micropipette.
- Imbuti separatori da 1.000 mL con rubinetto in teflon.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico con bruciatore aria/acetilene e munito di correttore di fondo e di lampada per il nichel. La linea di risonanza a 232,0 nm richiede un'ampiezza spettrale di 0,2 nm, altrimenti forti righe di emissioni molto prossime a 232,0 nm provocano una forte curvatura della retta di taratura. In ogni caso, la riga a 232,0 nm, anche ad un'ampiezza spettrale di 0,2 nm, fornisce una retta di taratura incurvata alle più alte concentrazioni.

2.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri o ultrapuri per analisi. L'acqua deve essere distillata su un bidistillatore in quarzo.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,17).

Acido cloridrico 6 M. Diluire 535 mL di acido cloridrico concentrato a 1.000 mL con acqua.

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Acido nitrico 5 M. Diluire 34 mL di acido nitrico concentrato a 100 mL con acqua.

Ammoniaca concentrata [NH_4OH] (d = 0,90).

Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare il MIBK con acqua prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perchè il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro.

Soluzione di sale di ammonio dell'acido 1-pirrolidinditiocarbossilico (APDC) 1 %. Sciogliere 1 g di APDC in 100 mL di acqua. La soluzione, che ha un aspetto opalescente, è stabile per un tempo brevissimo e va quindi preparata nella quantità necessaria al momento dell'uso. Inoltre detta soluzione prima dell'uso va estratta, almeno tre volte, con MIBK.

Soluzione tampone di acido acetico/acetato di ammonio. Sciogliere 250 g di acetato d'ammonio [CH_3COONH_4] in 150 mL di acqua ed aggiungere 600 mL di acido acetico glaciale [CH_3COOH] (d = 1,05). La soluzione può essere trattata in imbuto separatore da 1.000 mL con 7 mL di soluzione di APDC e 35 mL di MIBK, allo scopo di estrarre ed allontanare, con la fase organica, impurezze del metallo da analizzare, eventualmente presenti.

Soluzione standard concentrata di nichel (1 mL = 1 mg di Ni). Utilizzare lo standard per assorbimento atomico disponibile in commercio oppure sciogliere 1 g di nichel (esattamente pesato) in 50 mL di acido nitrico 5 M e portare a volume in un matraccio tarato da 1.000 mL con acqua. La soluzione, conservata in bottiglia di polietilene, è stabile per 6 mesi.

Soluzione standard diluita di nichel (1 mL = 3 μg di Ni). In matraccio tarato da 500 mL diluire 1,5 mL di soluzione standard concentrata con 0,5 mL di acido nitrico concentrato e portare a volume con acqua. Questa soluzione deve essere preparata giornalmente.

2.5. Procedimento

2.5.1. Dosaggio del campione

È opportuno trattare contemporaneamente almeno 4 campioni che non devono essere dissimili in termini di salinità per più dello 0,5%.

Portare un volume pari a 750 mL di ciascun campione in un imbuto separatore da 1.000 mL a pH 4÷5 con 8 mL di ammoniaca concentrata, se preventivamente acidificato con 5 mL di acido nitrico concentrato, altrimenti con 0,1 mL di acido cloridrico concentrato e, in ogni caso, con la successiva aggiunta di 4 mL di soluzione tampone di acido acetico/acetato di ammonio.

Aggiungere ad ogni campione 35 mL di MIBK e 7 mL di soluzione di APDC 1%. Agitare per 2 minuti, quindi lasciare stratificare. Quando le fasi si sono separate, recuperare gli strati inferiori acquosi (per la preparazione degli standard) e raccogliere integralmente gli strati organici in cilindri graduati da 50 mL, muniti di tappi a smeriglio.

Si misura l'assorbanza delle fasi organiche dei campioni e degli standard entro tre ore dall'estrazione, ad uno spettrofotometro ad assorbimento atomico a 232,0 nm, con ampiezza spettrale di 0,2 nm, con correttore di fondo inserito, contro MIBK. Precauzioni debbono essere prese per evitare l'evaporazione dal solvente con conseguente alterazione dei valori di concentrazione.

2.5.2. Taratura

In ciascuna delle fasi acquose provenienti dalle precedenti estrazioni (2.5.1.) e raccolte in imbuti separatori, aggiungere 20 mL di MIBK agitando per 2 minuti. Quando le fasi si sono separate, recuperare gli strati acquosi e scartare quelli organici. Questa operazione ha lo scopo di ottenere, per la preparazione degli standard, un'acqua il più possibile esente da tracce di nichel.

Mescolare tra loro gli strati acquosi e suddividere in 4 aliquote da 750 mL in altrettanti imbuti separatori da 1.000 mL. Addizionare ad esse 0 (bianco); 0,5; 1; 2 mL della soluzione standard diluita di Ni, ottenendo così 4 soluzioni con le seguenti concentrazioni di nichel: 0 (bianco); 2; 4; 8 $\mu g\ L^{-1}$, e quindi 20 mL di MIBK e 7 mL di APDC 1%. Agitare i 4 imbuti separatori e dopo stratificazione delle due fasi recuperare gli strati organici e scartare gli strati acquosi.
Procedere alla lettura dell'assorbanza come descritto al punto precedente.
Costruire la retta standard con le concentrazioni in $\mu g\ L^{-1}$ sull'asse delle ascisse e le assorbanze corrispondenti, corrette dal valore del bianco, sull'asse delle ordinate.

2.6. Espressione dei risultati

La concentrazione del nichel espressa in $\mu g\ L^{-1}$ nel campione analizzato viene ricavata dalla retta di taratura.

2.7. Precisione ed accuratezza

Su campioni di acqua marina costiera contenenti 0,2÷0,6 $\mu g\ L^{-1}$ di nichel, si sono ottenute deviazioni standard relative dell'ordine del 5%.
Prove di recupero effettuate sugli stessi campioni hanno fornito rese superiori al 90%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1983), Metodi di analisi per acque di mare, Quaderno 59 (Roma).
CNR-IRSA (1994), Metodi Analitici per le Acque, Quaderno 100 (Roma).

PIOMBO

1. Determinazione per assorbimento atomico

1.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso tra piombo e pirrolidintiocarbammato d'ammonio (APDC) ad un determinato pH. Il complesso viene estratto con metilisobutilchetone (MIBK) e la fase organica viene aspirata direttamente nella fiamma aria e acetilene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. L'assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 283,3 nm.
Il metodo consente la determinazione nelle acque naturali, di scarico, salmastre e marine del piombo a concentrazione compresa tra 0,01 e 0,5 mg L^{-1}. Per la determinazione del piombo a concentrazioni superiori è necessario diluire.

1.2. Interferenze e cause di errore

La presenza di metalli, come ferro, zinco, nichel, cadmio, cobalto, rame, manganese, argento, cromo fino ad un totale complessivo di 30 mg L^{-1}, non impedisce, nelle condizioni descritte nel procedimento, la chelazione e l'estrazione quantitativa del piombo. Particolare attenzione in questa fase deve essere rivolta al controllo del valore del pH. La presenza di detti elementi complessabili, in concentrazioni superiori al citato limite, provoca un errore in difetto che può essere eliminato aggiungendo ulteriori quantità di APDC. In ogni caso ciascuno dei singoli metalli, di cui sopra, non deve essere presente, nel campione in esame, a concentrazioni superiori a 10 mg L^{-1}.
La maggior parte delle interferenze dovute a sostanze non complessabili, eventualmente presenti nella matrice, viene eliminata con l'estrazione.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio. Tutta la vetreria deve essere preliminarmente lavata con acido nitrico diluito (1+9) caldo e accuratamente risciacquata con acqua.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, munito di bruciatore per fiamma aria-acetilene e corredato possibilmente di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico e di tutti gli altri indispensabili accessori.
- pH-metro, corredato di una coppia di elettrodi vetro-calomelano.
- Imbuti separatori da 300 mL con tappo di teflon.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. L'acqua deve essere deionizzata e distillata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Acido cloridrico [HCl] 0,3 M. Diluire 25 mL di HCl concentrato a 1.000 mL con acqua.
Acido cloridrico [HCl] 6 M. Miscelare volumi uguali di HCl concentrato e acqua.
Idrossido di sodio [NaOH] 2,5 M. Sciogliere 10 g di NaOH in acqua e diluire a 100 mL.
Carta amido-iodurata.
Soluzione di pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) 10 g L^{-1}. Sciogliere 1 g di APDC in 100 mL di acqua. Estrarre la soluzione, almeno tre volte, con metilisobutilchetone. La soluzione è stabile per una settimana in bottiglia di vetro scuro. Agitare bene prima dell'uso.
Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare il MIBK con acqua prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perchè il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro.
Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).
Soluzione acquosa di ipoclorito di sodio [NaCLO]. Soluzione all'8±2% m/m in cloro attivo. Conservare in bottiglia di vetro scuro.

Soluzione madre di piombo (1 mL = 1 mg di Pb). Sciogliere 1,599 g di nitrato di piombo [$Pb(NO_3)_2$] in acqua; acidificare con 5 mL di HNO_3 concentrato e portare a volume di 1.000 mL con acqua, omogeneizzando.

Soluzione standard di piombo (1 mL = 5 μg di Pb). Diluire 5 mL di soluzione madre di Pb a 1.000 mL con acqua acidificata con 5 mL di HNO_3 concentrato. Questa soluzione viene usata per preparare gli standard di taratura durante le analisi.

Soluzione di cloruro di sodio [NaCl], 300 g L^{-1}. Sciogliere 300 g di cloruro di sodio in 1.000 mL di acqua. Un'aliquota di 200 mL di questa soluzione viene trattata in un imbuto separatore con 1 mL di HCl 0,3 M, 5 mL di APDC e 20 mL di MIBK. Agitare manualmente 2 minuti, lasciare decantare per 1 notte alla temperatura di 5°C al riparo della luce e, infine, scartare la fase organica. Questa soluzione di cloruro di sodio si può conservare a lungo in bottiglia di vetro scuro.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

La taratura va eseguita all'inizio di ogni ciclo di analisi. In una serie di beaker da 400 mL, contenenti ciascuno 1 mL di HNO_3 concentrato, introdurre i volumi: 0; 1; 2; 5; 10; 20 mL della soluzione standard di piombo per avere concentrazioni pari a 0; 0,025; 0,05; 0,125; 0,250; 0,5 μg L^{-1} di piombo; diluire con acqua a 200 mL; addizionare in ogni beaker 5 mL di ipoclorito di sodio e 2,5 mL di HCl 6 M, bollire sotto cappa di aspirazione fino a che l'eccesso di cloro sia completamente eliminato, controllando mediante saggio alla tocca con carta amido-iodurata. Lasciare raffreddare a temperatura ambiente e portare la soluzione a pH 2,5 con la soluzione di NaOH 2,5 M, servendosi del pH-metro.

Nel caso di campioni di acque salmastre e di acque marine, sostituire l'acqua con un opportuno volume di soluzione di cloruro di sodio in modo che le soluzioni risultanti abbiano un contenuto salino paragonabile a quello del campione.

Travasare quantitativamente le soluzioni in una serie di imbuti separatori, con tappi di teflon, da 300 mL; aggiungere in ciascun imbuto 5 mL di APDC, agitare manualmente per 2 minuti e lasciare riposare per 10 minuti. Introdurre successivamente 20 mL di solvente MIBK, agitare vigorosamente per 2 minuti e lasciare poi separare gli strati. Raccogliere lo strato di solvente di ciascuna estrazione in una serie di matracci da 50 mL e tappare. Effettuare subito le letture allo spettrofotometro ad assorbimento atomico, aspirando le soluzioni organiche secondo la seguente procedura.

Mettere in funzione lo strumento, fissare la lunghezza d'onda a 283,3 nm e regolare l'apertura della fenditura secondo le istruzioni generali; fissare la posizione del bruciatore e regolare i flussi dei gas (aria-acetilene) seguendo le istruzioni ed accendere la fiamma. Aspirare il solvente MIBK, saturo d'acqua in modo da condizionare il nebulizzatore e ridurre il flusso di acetilene a valori tali che il segnale ritorni vicino allo zero. Ripetere l'operazione di azzeramento. Effettuare le misure aspirando le soluzioni organiche di taratura, registrando i valori di assorbanza letti. Intervallare ogni misura, aspirando solvente MIBK saturo di acqua, per circa 10÷15 secondi.

Tracciare la curva di taratura, ponendo in ascissa le concentrazioni di piombo, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza, corretti del bianco dei reattivi.

1.5.2. Determinazione piombo solubile

Porre in un beaker da 400 mL 200 mL di campione o parte aliquota da analizzare, filtrati precedentemente attraverso un filtro a membrana da 0,45 μm; aggiustare il pH a 2,5 con la soluzione di NaOH 2,5 M servendosi del pH-metro.

Travasare quantitativamente la soluzione in un imbuto separatore, con tappo di teflon, da 300 mL; aggiungere 5 mL di APDC, agitare manualmente per 2 minuti e lasciare riposare per 10 minuti. Introdurre successivamente 20 mL di solvente MIBK, agitare vigorosamente per 2 minuti e lasciare poi separare gli strati. Raccogliere lo strato di solvente in un matraccio da 50 mL e tappare. Effettuare subito la lettura allo spettrofotometro ad assorbimento atomico, aspirando la soluzione organica secondo la procedura indicata per la taratura.

1.5.3. Determinazione piombo totale

Portare 200 mL o parte aliquota di campione, precedentemente omogeneizzato per agitazione, in un beaker da 400 mL, aggiungere 5 mL di NaClO e 2,5 mL di HCl 6 M, bollire sotto cappa di aspirazione fino a che l'eccesso di cloro sia completamente eliminato controllando mediante saggio alla tocca con carta amido-iodurata. Raffreddare a temperatura ambiente e aggiustare il pH a 2,5 con soluzione di NaOH 2,5 M servendosi del pH-metro.

Travasare quantitativamente la soluzione in un imbuto separatore, con tappo di teflon, da 300 mL; aggiungere 5 mL di APDC, agitare manualmente per 2 minuti e lasciare riposare per 10 minuti. Introdurre successivamente 20 mL di solvente MIBK, agitare vigorosamente per 2 minuti e lasciare poi separare gli strati. Raccogliere lo strato di solvente in un matraccio da 50 mL e tappare. Effettuare subito la lettura allo spettrofotometro ad assorbimento atomico, aspirando la soluzione organica secondo la procedura indicata per la taratura.

1.5.4. Determinazione del bianco dei reattivi

Nel caso di determinazione del piombo disciolto, procedere come indicato al punto 1.5.2. sostituendo il volume del campione utilizzato con un identico volume di acqua acidificata con HNO_3 concentrato (5 mL HNO_3 per litro di acqua).

Nel caso di determinazione del piombo totale, procedere come descritto al punto 1.5.3. dopo aver provveduto alla sostituzione del volume del campione con un identico volume di acqua, previamente acidificata con HNO_3 concentrato (5 mL HNO_3 per litro di acqua).

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza rilevata, dopo aver sottratto il valore del bianco corrispondente, tramite la curva di taratura, risalire alla concentrazione di piombo nel campione in esame espresso in mg L^{-1}.

1.7. Precisione ed accuratezza

Le prove di sei diversi laboratori hanno fornito un recupero compreso tra il 95 e il 100% ed una deviazione standard relativa compresa tra lo 0,7 ed il 9,3%.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, XVIII ed., (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

POTASSIO

1. Determinazione per assorbimento atomico

1.1. Principio del metodo

Il potassio viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 766,5 nm.
Il metodo è applicabile alle acque per concentrazioni comprese fra 0,1 e 2 mg L^{-1} di potassio. Concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo opportunamente il campione. Nel caso in cui le concentrazioni da determinare siano notevolmente basse si ricorrerà al metodo delle aggiunte.

1.2. Interferenze e cause di errore

Per acque ad elevata salinità, dopo opportune diluizioni, si ricorrerà al metodo delle aggiunte per evitare interferenze o errori.

1.3. Apparecchiature

- Normale attrezzatura di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore per aria-acetilene e di tutti gli accessori necessari.

1.4. Reattivi

I reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua distillata e deionizzata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Soluzione standard di potassio (1 mL = 1 mg di K). Sciogliere 1,907 g di cloruro di potassio [KCl], essiccato a 110 °C, in acqua e portare a volume di 1.000 mL.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio ed alla fine di ogni ciclo di analisi.
Preparare 4 soluzioni di taratura tali che la concentrazione di potassio nel campione risulti compresa tra i loro valori. A tale scopo in 4 matracci da 100 mL diluire opportunamente la soluzione standard di potassio curando di aggiungere 1 mL di HCl concentrato. Preparare anche un bianco diluendo 1 mL di HCl a 100 mL. Aspirare le soluzioni e tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni in mg L^{-1} ed in ordinata le assorbanze corrette del valore del bianco.

1.5.2. Determinazione

1.5.2.1. Analisi del campione

A 80 mL di campione (o ad un'aliquota diluita) aggiungere 1 mL di HCl concentrato, e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare la soluzione ed il bianco, effettuare le letture di assorbanza e sottrarre il valore del bianco da quello della soluzione. Riportare il valore di assorbanza sul grafico di taratura e determinare la concentrazione corrispondente.
Se il campione risulta inquinato porre 80 mL di campione (o una sua aliquota diluita) in un beaker da 250 mL, aggiungere 1 mL di acido cloridrico concentrato, scaldare e far bollire per circa 10 minuti. Raffreddare, filtrare lavando opportunamente il filtro, e portare a volume di 100 mL in matraccio tarato.

1.5.2.2. Metodo delle aggiunte
Preparare 4 aliquote di campione (eventualmente diluito) da 80 mL, a tre di esse aggiungere volumi (fino ad un massimo di 9 mL) di soluzione standard tali da ottenere concentrazioni diverse che comprendano nel loro intervallo la concentrazione incognita da determinare. Aggiungere poi 1 mL di HCl concentrato, e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare le soluzioni ed il bianco, effettuare le letture di assorbanza, quindi sottrarre il valore del bianco da quello delle soluzioni. Riportare in un grafico sull'asse delle ordinate i valori di assorbanza ottenuti e in ascissa i valori di concentrazione delle soluzioni ottenuti dopo le aggiunte standard. La retta passante per i punti così individuati incontra l'asse delle ascisse in un punto (di valore negativo sul grafico) corrispondente alla concentrazione del campione in esame.

1.6. Espressione dei risultati
Dal valore di assorbanza misurato, la concentrazione di K^+ espressa in mg L^{-1} è data da:

$$K^+ \text{ (mg L}^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V}$$

dove:
a = concentrazione di potassio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
V = volume di campione (in mL) usato.

La concentrazione di K^+ espressa in meq L^{-1} è data da:

$$K^+ \text{ (meq L}^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V \cdot 39{,}102}$$

dove:
a = concentrazione di potassio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
V = volume di campione (in mL) usato;
39,102 = peso equivalente del potassio.

1.7. Precisione ed accuratezza
La deviazione standard (determinata su un campione avente un valore medio misurato di 2,52 mg L^{-1}) è risultata ±0,04 mg L^{-1}. Su un campione contenente 2,5 mg L^{-1} si sono ottenuti recuperi superiori al 99%.

Bibliografia
CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

RAME

1. Determinazione colorimetrica (acque dolci e marine)

1.1. Principio del metodo

Il rame in soluzione acquosa reagisce con ossalildiidrazide-acetaldeide a pH 9,3 per dare un complesso molto stabile di colore viola intenso la cui assorbanza è misurata a 540 nm.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, marine e di scarico nell'intervallo compreso tra 0,05 e 0,50 mg L^{-1} utilizzando celle da 5 cm di percorso e tra 0,50 e 2,0 mg L^{-1} con celle da 1 cm.

1.2. Interferenze e cause di errore

Il metodo presenta interferenze con cianuri e sostanze organiche, che possono essere eliminate per semplice digestione acida con miscela solfo-nitrica del campione in esame.
Non danno interferenze concentrazioni fino a 10 mg L^{-1} di piombo, 3 mg L^{-1} di zinco, 3 mg L^{-1} di nichel, 3 mg L^{-1} di cadmio, 10 mg L^{-1} di alluminio, 10 mg L^{-1} di Fe(III), 3 mg L^{-1} di manganese, 3 mg L^{-1} di stagno, 3 mg L^{-1} di Co, 2,5 mg L^{-1} di Se, 1,5 mg L^{-1} di Cr(III), 1.000 mg L^{-1} di polifosfati come P_2O_7, 1.000 mg L^{-1} di ortofosfati come PO_4, 1.000 mg L^{-1} di solfati come SO_4, 1.000 mg L^{-1} di cloruri come Cl.
La presenza contemporanea dei metalli citati, alle suddette concentrazioni, non ha manifestato alcun fenomeno di sinergismo.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro per misure alla lunghezza d'onda di 540 nm con vaschette di cammino ottico di 5 cm.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua distillata e/o deionizzata.
Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).
Acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84).
Soluzione di ammoniaca concentrata [NH_4OH] (d = 0,892).
Soluzione di acido citrico al 50%. Sciogliere 500 g di acido citrico [$C_6H_8O_7$] in acqua e portare a 1.000 mL.
Soluzione di idrossido di sodio al 30%. Sciogliere 300 g di sodio idrato [NaOH] in acqua e portare a 1.000 mL.
Soluzione di ossalildiidrazide al 2,5%. Sciogliere 2,5 g di ossalildiidrazide [$(CONHNH_2)_2$] in acqua e portare a 1.000 mL.
Soluzione di acetaldeide al 40%. Sciogliere 400 g di acetaldeide [CH_3CHO] in 1.000 mL di acqua. Essendo il punto di ebollizione dell'acetaldeide di 21°C, la preparazione di questa soluzione richiede alcune precauzioni. Raffreddare la fiala chiusa contenente l'acetaldeide e versarla in un matraccio tarato da 1.000 mL contenente circa 700 mL di acqua in un bagno di acqua ghiacciata. Poiché nel mescolare si ha un aumento di temperatura, versare lentamente l'acetaldeide nell'acqua e portare a volume.
Soluzione standard concentrata di rame (1 mL = 1 mg di Cu). Pesare 1 g di rame puro e trasferirli in beaker da 250 mL. Aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato, 5 mL di acqua e scaldare fino a secco per eliminare l'eccesso di acido. Riprendere il residuo con 50 mL di acqua e travasare quantitativamente la soluzione in matraccio tarato da 1.000 mL portando a volume con acqua.
Soluzione standard diluita di rame (1 mL = 0,005 mg di Cu). Introdurre 5 mL di soluzione standard concentrata in matraccio tarato da 1.000 mL e portare a volume con acqua.

1.5. Procedimento

1.5.1. Mineralizzazione

Qualora la natura del campione lo richieda (presenza di sostanze organiche) trasferire 100 mL di campione in beaker da 200 mL, aggiungere 5 mL di acido solforico concentrato e 5 mL di acido nitrico concentrato, evaporare su piastra elettrica o bagno di sabbia fino a sviluppo di fumi bianchi. Se il residuo non è incolore, aggiungere ancora 5 mL di acido nitrico e rievaporare fino a fumi bianchi. Ripetere il trattamento con acido nitrico fino ad ottenere una soluzione limpida ed incolore. Riprendere con 2 porzioni di 10 mL di acqua, evaporando ogni volta fino a sviluppo di fumi bianchi. Raffreddare, aggiungere 10 mL di acqua e neutralizzare a pH 7 con soluzione di sodio idrato al 30%. Raffreddare e riportare il volume a 100 mL in matraccio tarato.

1.5.2 Determinazione

Trasferire 50 mL di campione (eventualmente mineralizzato) in un matraccio tarato da 100 mL. Aggiungere nell'ordine, mescolando dopo ogni aggiunta, 2,5 mL di acido citrico, 8 mL di soluzione di ammoniaca concentrata, 10 mL di soluzione di acetaldeide, 10 mL di soluzione di ossalildiidrazide, portare a volume con acqua e mescolare. Attendere 30 minuti per consentire lo sviluppo completo del colore mantenendo i matracci al buio, poi misurare l'assorbanza con celle da 5 cm di percorso ottico, alla lunghezza d'onda di 540 nm, usando un bianco dei reattivi come riferimento.

1.5.3. Taratura

Trasferire 0; 0,5; 1; 2,5; 5 mL di soluzione standard diluita di rame in matracci tarati da 100 mL e diluire a 50 ml con acqua in modo da avere concentrazioni di 0; 0,05, 0,1; 0,25; 0,50 mg L^{-1}

Aggiungere nell'ordine, mescolando dopo ogni aggiunta, 2,5 mL di acido citrico, 8 mL di soluzione di ammoniaca concentrata, 10 mL di soluzione di acetaldeide, 10 mL di soluzione di ossalildiidrazide, portare a volume con acqua e mescolare. Attendere 30 minuti per consentire lo sviluppo completo del colore mantenendo i matracci al buio, poi misurare l'assorbanza con celle da 5 cm di percorso ottico, alla lunghezza d'onda di 540 nm, usando un bianco dei reattivi come riferimento.
Costruire la curva di taratura riportando in ascissa le concentrazioni di rame in mg L^{-1} e in ordinata i valori di assorbanza.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurato sul campione risalire alla concentrazione in mg L^{-1} direttamente dalla curva di taratura.

1.7. Precisione ed accuratezza

Prove effettuate su campioni sintetici e su campioni reali hanno fornito valori di deviazione standard relativa compresi tra il 3 e l'8% nell'intervallo tra 0,05 e 0,1 mg L^{-1} e valori di recupero compresi tra l'86 e il 105%.

2. Determinazione per assorbimento atomico (acque dolci)

2.1. Principio del metodo

Il rame viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico in fiamma, alla lunghezza d'onda di 324,7 nm.
Il metodo consente la determinazione del rame, disciolto o solubilizzabile con i trattamenti indicati in seguito, in campioni di acque naturali e di scarico, sia industriali che urbane, nell'intervallo di concentrazione da 0,02 a 5 mg L^{-1} di Cu. Per concentrazioni superiori a 5 mg L^{-1} è possibile rientrare in detto intervallo ricorrendo alla diluizione del campione.

2.2. Interferenze e cause di errore

Sodio, potassio, solfati e cloruri (fino a 8 g L^{-1} ciascuno), calcio, magnesio (fino a 5 g L^{-1} ciascuno), nitrati (fino a 2 g L^{-1}), ferro (fino a 1 g L^{-1}), cadmio, piombo, nichel, zinco, cobalto, manganese e cromo (fino a 10 mg L^{-1} ciascuno) non interferiscono.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio. Tra i vari sistemi proponibili per il lavaggio della vetreria risulta conveniente quello che impiega acido nitrico diluito caldo. Comunque, qualunque sia la soluzione di lavaggio adottata, è necessario successivamente sciacquare abbondantemente con acqua deionizzata e distillata.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico. Corredato possibilmente di dispositivo per la correlazione automatica dell'assorbimento non specifico, di bruciatore standard per aria-acetilene e di tutti gli altri accessori necessari.

2.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere deionizzata e distillata.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1, 19).

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Acido nitrico diluito (1+199). Aggiungere 1 volume di HNO_3 concentrato a 199 volumi di acqua.

Soluzione standard concentrata di rame (1 mL = 1 mg di Cu). Trattare 1 g di rame elettrolitico con 15 mL di HNO_3 concentrato e 15 mL di acqua. Scaldare con precauzione fino a completa soluzione. Raffreddare e diluire a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard diluita di rame (1 mL = 0,1 mg di Cu). Diluire 100 mL della soluzione concentrata di Cu e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard molto diluita di Cu (1 mL = 0,01 mg di Cu). Diluire 100 mL di soluzione standard diluita di Cu e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

2.5. Procedimento

Eseguire le operazioni consigliate nel manuale di istruzione dello strumento e selezionare la lunghezza d'onda di 324,7 nm.

La determinazione del rame potrà essere ottenuta aspirando la soluzione in fiamma ed effettuando la lettura dell'assorbanza. L'operazione può riguardare la frazione disciolta del rame oppure, oltre a questa, la frazione solubilizzabile a seguito del trattamento del campione con acido cloridrico o nitrico come descritto di seguito. In quest'ultimo caso è necessario sottoporre standard e bianco allo stesso trattamento del campione.

2.5.1. Trattamento con acido cloridrico

Prelevare 100 mL di campione e versarli in un beaker. Aggiungere 5 mL di acido cloridrico concentrato e scaldare su bagno ad acqua o su piastra sino a che il volume sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Lavare le pareti del beaker con acqua e raccoglierla nello stesso matraccio. Portare a volume con acqua.

2.5.2. Trattamento con acido nitrico

Prelevare 100 mL di campione e versarli in un beaker. Aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato e scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare il beaker ed aggiungere altri 5 mL di acido nitrico concentrato. Coprire il beaker con vetrino da orologio e ripetere il trattamento il numero di volte necessario per ottenere la digestione completa del campione (ciò è indicato da un residuo debolmente colorato). Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti del beaker ed il vetrino da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matraccio tarato.

2.5.3. Taratura

È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio e alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente, la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente di Cu con acido nitrico diluito (1+199) e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico diluito (1+199) (bianco). La concentrazione di rame nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentratone delle soluzioni impiegate per la taratura.
Aspirare le soluzioni ottenute oppure quelle ottenute sottoponendo standard e bianco trattamenti indicati in 2.5.1. o 2.5.2. ed effettuare le letture delle assorbanze.
Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito (1+199) per circa 10÷15 secondi. Costruire la curva di calibrazione ponendo in ascissa le concentrazioni del rame, espresse in mg L^{-1}, ed in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

2.5.4. Determinazione del rame disciolto

Aspirare il campione filtrato subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 µm ed a cui sono stati aggiunti 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro e leggere l'assorbanza corretta del bianco.

2.5.5. Determinazione del rame dopo trattamento con acidi

Aspirare la soluzione proveniente da 2.5.1. o 2.5.2. e leggere la assorbanza corretta del bianco trattato come la soluzione.

2.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurata e corretta del valore del bianco si risale, tramite la curva di taratura, tenendo conto delle eventuali diluizioni effettuate, alla concentrazione di rame, espressa in mg L^{-1}, nel campione in esame.

2.7. Precisione ed accuratezza

Prove effettuate da sette differenti laboratori su campioni di acque di scarico prima e dopo aggiunte di quantità note di rame, in modo da ottenere campioni con concentrazione di circa 0,1 mg L^{-1} hanno dato i seguenti risultati:
- i valori della deviazione standard relativa sono risultati compresi tra 3,1 e 10%;
- i recuperi relativi delle quantità aggiunte sono risultati compresi tra il 90 e il 100%.

3. Determinazione per assorbimento atomico (acque marine)

3.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla estrazione, con un piccolo volume di metilisobutilchetone (MIBK), del complesso formato dal rame con il sale di ammonio dell'acido 1-pirrolidinditiocarbossilico (APDC), allo scopo di concentrare il metallo e di eliminare le interferenze derivanti dalla matrice salina dell'acqua di mare. Complessazione ed estrazione sono possibili in un ampio intervallo di pH; ma si preferisce operare tra pH 4 e 5 per avere una resa ottimale ed una migliore stabilità dei complesso.
Poiché l'efficienza dell'estrazione del complesso Cu-APDC e la solubilità del MIBK sono legate alla salinità e alla temperatura, è necessario che gli standard siano preparati impiegando la stessa matrice salina dei campioni e che sia gli standard che i campioni siano trattati ad una temperatura costante e quanto più possibile vicina a 20°C.

La fase organica viene aspirata direttamente nella fiamma aria/acetilene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 324,8 nm.
Il metodo può essere impiegato per determinare concentrazioni di rame nell'intervallo 0,2÷10 µg L^{-1}.

3.2. Interferenze e cause di errore
Per il rame generalmente non si riscontrano fenomeni di interferenze derivanti dalle specie chimiche presenti nell'acqua marina.

3.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio. Per il prelievo di piccoli volumi nella preparazione degli standard è consigliabile l'impiego di micropipette.
- Imbuti separatori da 1.000 mL con rubinetto in teflon.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico con bruciatore aria/acetilene munito di correttore di fondo e di lampada per il rame.

3.4. Reattivi
Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e qualora possibile di grado ultrapuro. L'acqua deve essere distillata su un bidistillatore in quarzo.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,17).
Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,40).
Soluzione di ammoniaca concentrata [NH_4OH] (d = 0,90).
Acido acetico glaciale [CH_3COOH] (d = 1,05).
Acetato di ammonio [CH_3COONH_4].
Metilisobutilchetone (4-metilpentan-2-one) (MIBK). Il solvente deve essere distillato di fresco. È necessario presaturare il MIBK con acqua prima dell'estrazione. **Trattare con cautela perchè il solvente è infiammabile e particolarmente tossico.** Conservare in bottiglia di vetro.
Soluzione di Acido 1-pirrollidinditiocarbossilico sale di ammonio (APDC) 1%. Sciogliere 1 g di APDC in 100 mL di acqua. La soluzione, che ha un aspetto opalescente, è stabile per un tempo brevissimo e va quindi preparata nella quantità necessaria, al momento dell'uso. La soluzione, prima dell'uso, va estratta, almeno tre volte. con MIBK.
Soluzione di acido cloridrico 2 M. Diluire 535 mL di acido cloridrico concentrato a 1.000 mL con acqua.
Soluzione tampone di acetato di ammonio-acido acetico. Sciogliere 250 g di acetato d'ammonio in 150 mL di acqua e aggiungere 600 mL di acido acetico glaciale. La soluzione può essere trattata in imbuto separatore da 1.000 mL con 7 mL di soluzione di APDC e 35 mL di MIBK, allo scopo di estrarre ed allontanare con la fase organica le impurezze del metallo da analizzare eventualmente presenti.
Soluzione di acido nitrico 5 M. Diluire 34 mL di acido nitrico concentrato a 100 mL con acqua.
Soluzione standard concentrata di rame (1 mL = 1 mg di Cu). Utilizzare lo standard per assorbimento atomico disponibile in commercio, oppure prepararlo pesando esattamente 1 g di rame, sciogliendolo in 50 mL di acido nitrico 5 M e portarlo a volume con acqua in un matraccio tarato da 1.000 mL. La soluzione, conservata in bottiglia di polietilene, è stabile per 6 mesi.
Soluzione standard diluita di Cu (1 mL = 3 µg di Cu). Diluire 0,60 mL di soluzione concentrata di rame a 200 mL con acqua contenente 0,2 mL di acido nitrico concentrato. Questa soluzione deve essere preparata giornalmente.

3.5. Procedimento

3.5.1. Dosaggio del campione

È opportuno trattare contemporaneamente almeno 4 campioni che non devono essere dissimili in termini di salinità per più dello 0,5%.

Portare un volume pari a 750 mL di ciascun campione a pH 4÷5 in un imbuto separatore da 1.000 mL aggiungendo 8 mL di soluzione di ammoniaca concentrata, se preventivamente acidificato con 5 mL di acido nitrico concentrato o, altrimenti con 0,1 mL di acido cloridrico concentrato. In ogni caso occorre aggiungere 4 mL di soluzione tampone di acetato d'ammonio-acido acetico.

Aggiungere 5 mL di MIBK e 7 mL di soluzione APDC 1% ad ogni campione. Agitare per 2 minuti, quindi lasciare stratificare. Quando le fasi si sono separate, recuperare separatamente gli strati inferiori acquosi che serviranno per la preparazione degli standard.

Raccogliere integralmente gli strati organici in cilindri graduati da 50 mL, muniti di tappi a smeriglio.

Misurare l'assorbanza dei campioni nella stessa giornata dell'estrazione, ad uno spettrofotometro ad assorbimento atomico a 324.8 nm, con correttore di fondo inserito, contro MIBK. Precauzioni debbono essere prese per evitare l'evaporazione dei solvente con conseguente alterazione dei valori di concentrazione.

3.5.2. Taratura

In ciascuna delle fasi acquose, provenienti dalle precedenti estrazioni e raccolte in imbuti separatori, aggiungere 20 mL di MIBK, agitando per 2 minuti. Quando le fasi si sono separate, recuperare gli strati acquosi e scartare gli strati organici. Questa operazione ha lo scopo di ottenere, per la preparazione degli standard, un'acqua il più possibile esente da tracce di rame.

Combinare tra loro gli strati acquosi e suddividere in 4 aliquote da 750 mL in altrettanti imbuti separatori da 1.000 mL. Addizionare ad esse 0 (bianco); 0,5; 1; 2 mL di standard diluito, ottenendo così 4 soluzioni con le seguenti concentrazioni di rame: 0 (bianco); 2; 4; 8 μg L^{-1}. Aggiungere quindi 20 mL di MIBK e 7 mL di APDC. Si agitano i 4 imbuti separatori e dopo stratificazione delle due fasi si recuperano gli strati organici e si scartano gli strati acquosi.

Misurare l'assorbanza dei campioni nella stessa giornata dell'estrazione, ad uno spettrofotometro ad assorbimento atomico a 324.8 nm, con correttore di fondo inserito, contro MIBK. Precauzioni debbono essere prese per evitare l'evaporazione dei solvente con conseguente alterazione dei valori di concentrazione.

Si costruisce la retta standard con le concentrazioni sull'asse delle ascisse e le assorbanze corrispondenti corrette del bianco sull'asse delle ordinate.

3.6. Espressione dei risultati

Dall'assorbanza del campione, corretta del bianco, tenuto conto delle eventuali diluizioni, si ricava la concentrazione del rame, espressa in μg L^{-1}.

3.7. Precisione ed accuratezza

Su campioni di acqua marina costiera contenenti 0,5÷3 μg L^{-1} di rame si sono ottenute deviazioni standard relative intorno al 5%.

Prove di recupero effettuate sugli stessi campioni hanno fornito rese superiori al 95%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1983), *Metodi di analisi per acque di mare*, Quaderno 59 (Roma).

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

SILICE

1. Determinazione colorimetrica (acque dolci)

1.1. Principio del metodo

La silice viene determinata mediante colorimetria. Il metodo si basa sulla formazione di un complesso giallo tra lo ione silicico e molibdato d'ammonio e la successiva riduzione a blu di molibdeno dosabile spettrofotometricamente a 650 nm.

Il metodo è applicabile per acque naturali e/o di scarico con concentrazioni di silice inferiori a 10 mg L^{-1}.

1.2. Interferenze e cause di errore

Lo ione fosfato nelle stesse condizioni fornisce la stessa colorazione. Tale interferenza può essere eliminata mediante aggiunta di acido ossalico che scinde il complesso fosfomolibdico.

L'acido ossalico elimina anche l'interferenza con composti tannici eventualmente presenti.

Il ferro, se presente nel campione in concentrazioni superiori a 0,5 mg L^{-1} può abbassare l'intensità del colore. È opportuno in questo caso eseguire la determinazione su un campione diluito con acqua distillata.

Il colore e la torbidità del campione inficiano la determinazione finale ma tali effetti possono essere compensati con la lettura del bianco.

La silice presente nel campione può reagire in modo non quantitativo, la frazione "non reattiva al molibdato" può essere dosata con lo stessa procedura previa digestione con carbonato sodico.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio lavata con HCl diluito (1+1) e successivamente sciacquata con acqua bidistillata (è consigliabile utilizzare per questa determinazione sempre la medesima vetreria).
- Spettrofotometro o fotometro a filtri per misure tra 600 e 700 nm con celle di cammino ottico da 1 a 10 cm.
- Filtri Whatman n° 542.

1.4. Reattivi

Acido cloridrico diluito (1+1) [HCl].

Reattivo molibdico. Sciogliere 10 g di molibdato di ammonio tetraidrato [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot4H_2O$] in acqua e diluire a 100 mL, filtrare se necessario e portare il pH a 8÷9 con ammoniaca concentrata. Conservare la soluzione così ottenuta in bottiglie di polietilene. Il reattivo è stabile per circa tre mesi.

Acido ossalico. Sciogliere 10 g di acido ossalico [$H_2C_2O_4\cdot2H_2O$] in acqua e portare il volume a 100 mL.

Soluzione riducente. Sciogliere 0,5 g di acido 1-ammino-2-naftol 4-solfonico e 1 g di solfito di sodio anidro [Na_2SO_3] in 50 mL di acqua distillata, scaldare debolmente per favorire la dissoluzione. A questa soluzione aggiungere una soluzione preparata sciogliendo 27,4 g di metabisolfito di sodio [$Na_2S_2O_5$] in 150 mL di acqua distillata. Filtrare se necessario, e conservare in bottiglie di plastica. La soluzione deve essere ripreparata non appena imbrunisce.

Soluzione standard concentrata di silice (1 mL = 1 mg di SiO_2). Sciogliere 4,732 g di metasilicato di sodio [$Na_2SiO_3\cdot9H_2O$] in acqua distillata previamente bollita e raffreddata; diluire a 1.000 mL. Alternativamente questo reattivo può essere preparato facendo fondere in un crogiolo di platino 1 g di quarzo, previamente essiccato, intimamente mescolato con 4÷6 g di una miscela in parti uguali di carbonato di sodio e carbonato di potassio. La fusione è ultimata quando cessa lo sviluppo di CO_2.

Per accertarsi dell'avvenuta dissoluzione di tutto il quarzo posto a fondere è consigliabile controllare per via gravimetrica il titolo in SiO_2 dello standard.

Soluzione standard diluita di silice (1 mL = 0,01 mg di SiO_2). Portare 10 mL della soluzione standard concentrata di silice a 1.000 mL con acqua distillata previamente bollita e raffreddata. Conservare la soluzione in bottiglie di plastica.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

Portare a volume in matracci tarati da 50 mL con acqua distillata previamente bollita e raffreddata sei diverse aliquote note di soluzione standard diluita di silice. Aggiungere ad ogni soluzione 1 mL di acido cloridrico diluito (1+1) e poi 2 mL di reattivo molibdico. Agitare e lasciare riposare per circa 5 minuti, quindi aggiungere 1,5 mL di acido ossalico e 2 mL di soluzione riducente. Agitare vigorosamente e dopo 15 minuti dall'aggiunta del reattivo riducente leggere l'assorbanza a 650 nm in celle da 1 cm (o più, se necessario) contro un bianco di acqua distillata trattata allo stesso modo degli standards. Costruire una retta di taratura riportando in ascissa i mg di silice presenti in ogni standard e in ordinata l'assorbanza corretta per il bianco.

1.5.2. Dosaggio del campione

Filtrare il campione, al fine di eliminare la silice insolubile, su un filtro Whatman n° 542. A 50 mL di filtrato aggiungere 1 mL di acido cloridrico diluito (1+1) e poi 2 mL di reattivo molibdico. Agitare e lasciare riposare per circa 5 minuti, quindi aggiungere 1,5 mL di acido ossalico e 2 mL di soluzione riducente. Agitare vigorosamente e dopo 15 minuti dall'aggiunta del reattivo riducente leggere l'assorbanza a 650 nm in celle da 1 cm (o più, se necessario) contro un bianco di acqua distillata trattata allo stesso modo.

1.6. Espressione dei risultati

La concentrazione della silice solubile e/o colloidale si ottiene dalla formula:

$$SiO_2\ (mg\ L^{-1}) = \frac{P}{C} \cdot 1.000$$

dove:

P = mg di silice ottenuti dalla retta di taratura in base al valore di assorbanza misurata e corretta rispetto al bianco;

C = mL di campione prelevato per la determinazione.

1.7. Precisione ed accuratezza

Non è possibile fornire una definizione generale della precisione del metodo a causa delle diverse combinazioni chimiche della silice nelle acque. Con sali sintetici i valori di deviazione standard percentuale risultano inferiori al 10%.

2. Determinazione colorimetrica dei silicati (acque marine)

2.1. Principio del metodo

La silice presente nelle acque di mare in determinate condizioni di pH forma con il molibdato di ammonio un poliacido silicomolibdico che ridotto a blu di molibdeno, con metolo e solfito, presenta un massimo di assorbimento a 810 nm.

2.2. Interferenze e cause di errore

Il prodotto di reazione è fortemente influenzato dal pH: tale valore nella miscela finale deve mantenersi tra 1,8÷2. Talvolta il cattivo mescolamento della miscela di reazione può causare una scorretta valutazione del pH e può anche determinare la formazione di un composto colorato, dovuto alla riduzione diretta del molibdato e non del poliacido.
La formazione di poliacidi con il molibdato è caratteristica anche di altri ioni, in particolare fosfato e arseniato.
L'interferenza dello ione fosfato viene eliminata per aggiunta di acido ossalico.
Cationi quali ferro, rame, cobalto e nichel interferiscono per il colore dei loro ioni. In tal caso, oltre alla registrazione del bianco dei reagenti, occorre misurare l'assorbanza del campione senza aggiunta di reattivi e addizionare questo valore al bianco dei reagenti.
Gli ioni ferro interferiscono se formano nel corso della reazione molibdato ferrico: in tal caso prima dell'analisi occorre aggiungere al campione una soluzione di idrocloruro di idrossilammina.
I solfuri, se presenti in concentrazione superiore a 5 mg L^{-1}, influenzano lo sviluppo del colore e devono essere ossidati con acqua di bromo.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria da laboratorio lavata con HCl diluito (1+1) e successivamente sciacquata con acqua bidistillata (è consigliabile utilizzare per questa determinazione sempre la medesima vetreria).
- Filtri in fibra di vetro con porosità di 0,5÷0,8 µm.
- Filtri Whatman n° 1.
- Spettrofotometro o colorimetro sensibile a 810 nm con celle da almeno 5 cm di cammino ottico.

2.4. Reattivi

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Acido solforico 50% v/v. Versare 250 mL di acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84) in 250 mL di acqua. Raffreddare e portare a volume di 500 mL con acqua.
Reattivo molibdico. Sciogliere 4 g di ammonio molibdato tetraidrato [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$•$4H_2O$] in 300 mL di acqua; diluire 12 mL di acido cloridrico concentrato in 100÷150 mL di acqua e sotto costante agitazione aggiungere la soluzione di molibdato a quella di acido. Portare il volume della soluzione ottenuta a 500 mL. Conservare la soluzione in bottiglie di polietilene lontano dalla luce. In condizioni normali la soluzione è stabile per molti mesi, deve essere ripreparata se si forma un precipitato bianco o assume una colorazione blu.
Soluzione di metolo e solfito. Sciogliere 6 g di solfito di sodio anidro [Na_2SO_3] in 400 mL di acqua; aggiungere sotto agitazione 10 g di metolo (4-metilamminofenolosolfato) [$(CH_3NHC_6H_4OH)_2$ •H_2SO_4)] fino a completa dissoluzione. Filtrare su filtro Whatman n° 1 e portare il volume a 500 mL con acqua. Conservare in bottiglia di vetro borosilicato; il reattivo è stabile per circa un mese.
Soluzione di acido ossalico. Preparare una soluzione satura sciogliendo 50 g di acido ossalico [$C_2H_2O_4$•$2H_2O$] in 400 mL di acqua. Decantare la soluzione e portarla a volume in matraccio da 500 mL. Conservare la soluzione in bottiglie di polietilene. Il reattivo è stabile indefinitamente.
Reagente riducente. Mescolare 100 mL di soluzione di metolo e solfito con 60 mL di soluzione di acido ossalico. Aggiungere lentamente 60 mL di acido solforico 50% e portare a volume di 300 mL con acqua. Questo reagente va preparato immediatamente prima dell'uso.
Soluzione standard di silicato 10 mmoli L^{-1}. Riscaldare la silice a 1.000°C, raffreddarla in essiccatore e portarla a peso costante. Pesare 601 mg di silice in crogiolo di platino e aggiungere 1,5 g di carbonato di sodio anidro [Na_2CO_3]. Mescolare con una spatola e fondere il prodotto a 1.000°C fino a che non assuma un colore chiaro. Raffreddare, sciogliere in più porzioni di acqua bollente e portare il volume a 1.000 mL con acqua. Trasferire rapidamente in bottiglia di polietilene ad alta densità. La soluzione si mantiene stabile per alcuni mesi.
Alternativamente è possibile utilizzare esafluorosilicato di sodio [Na_2SiF_6], precedentemente essiccato in crogiolo metallico a 150°C. In questo caso è consigliabile preparare uno standard con con-

centrazione non superiore a 2 mmoli L^{-1} e regolare di conseguenza le successive diluizioni. Pesare, in base al grado di purezza analitica, 2 mmoli di esafluorosilicato di sodio e sciogliere, riscaldando debolmente, in 700 mL di acqua distillata in un contenitore di plastica: portare a volume in matraccio da 1.000 mL e travasare rapidamente in bottiglie di plastica. La soluzione è stabile per alcuni mesi.

2.5. Procedimento

2.5.1. Taratura

Preparare 5 soluzioni standard di silicato tra 1 e 0,01 mmoli L^{-1} diluendo 0,1; 0,2; 0,5; 0,75 e 1 mL di standard 10 mmoli L^{-1} in matracci tarati da 100 mL e portare a volume con acqua. Prelevare 25 mL di ogni standard così ottenuto e, sotto costante agitazione, aggiungere 10 mL di reattivo molibdico. Lasciare reagire per almeno 15 minuti ma non più di 30 minuti e comunque mantenere costante il tempo di reazione per standard e campione. Aggiungere, sempre mescolando, 15 mL di reagente riducente. Lasciar reagire per 1 ora avendo cura, anche in questo caso, che il tempo di reazione sia lo stesso per standard e campione. Misurare l'assorbanza di ciascuno standard a 810 nm corretta del bianco dei reagenti ottenuto trattando acqua distillata allo stesso modo degli standard. Costruire quindi una retta di taratura riportando in grafico le concentrazioni degli standard espresse in μmoli L^{-1} contro l'assorbanza registrata.

2.5.2. Dosaggio

Se il campione è stato conservato in congelatore scongelarlo lontano dalla luce e procedere all'analisi non prima di 12 ore.

Prelevare 25 mL di campione e, sotto costante agitazione, aggiungere 10 mL di reattivo molibdico. Lasciare reagire per almeno 15 minuti ma non più di 30 minuti e comunque mantenere costante il tempo di reazione per standard e campione. Aggiungere, sempre mescolando, 15 mL di reagente riducente. Lasciar reagire per 1 ora avendo cura, anche in questo caso, che il tempo di reazione sia lo stesso per standard e campione. Misurare l'assorbanza a 810 nm.

2.6. Espressione dei risultati

Dalla retta di taratura e dal valore di assorbanza del campione si risale alla concentrazione in silicati espressa in μmoli L^{-1}.

2.7. Precisione ed accuratezza

Non è possibile fornire una definizione generale della precisione del metodo a causa delle diverse combinazioni chimiche della silice nelle acque.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).
Catalano G., AA (1990), *Silicati*, Nova Thalassia Vol II.

SODIO

1. Determinazione per assorbimento atomico

1.1. Principio del metodo

Il sodio viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 589,0 nm.
Il metodo è applicabile alle acque per concentrazioni comprese fra 0,02 e 1 mg L^{-1} di sodio. Concentrazioni più elevate possono essere determinate diluendo opportunamente il campione. Nel caso in cui le concentrazioni da determinare siano notevolmente basse si ricorrerà al metodo delle aggiunte.

1.2. Interferenze e cause di errore

Per acque ad elevata salinità, dopo opportune diluizioni, si ricorrerà al metodo delle aggiunte per evitare interferenze o errori.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore per aria-acetilene e di tutti gli accessori necessari.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua distillata e deionizzata.
Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).
Soluzione standard di sodio (1 mL = 1 mg di Na). Sciogliere 2,542 g di cloruro di sodio [NaCl], precedentemente essiccato a 180°C, e portare a volume di 1.000 mL.

1.5. Procedimento

1.5.1. Taratura

È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio ed alla fine di ogni ciclo di analisi. Preparare 4 soluzioni di taratura tali che la concentrazione di sodio nel campione risulti compresa tra i loro valori. A tale scopo diluire opportunamente in 4 matracci da 100 mL la soluzione standard di sodio curando di aggiungere 1 mL di HCl concentrato. Preparare anche un bianco diluendo 1 mL di HCl concentrato a 100 mL. Aspirare le soluzioni e tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni ed in ordinata le assorbanze corrette del valore del bianco.

1.5.2. Determinazione

1.5.2.1. Analisi del campione

A 80 mL di campione (o ad un'aliquota diluita) aggiungere 1 mL di HCl concentrato, e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare la soluzione ed il bianco, effettuare le letture di assorbanza e sottrarre il valore del bianco da quello della soluzione. Riportare il valore di assorbanza sul grafico di taratura e determinare la concentrazione corrispondente.

1.5.2.2. Metodo delle aggiunte

Preparare 4 aliquote di campione (eventualmente diluito) da 80 mL, a tre di esse aggiungere volumi (fino ad un massimo di 9 mL) di soluzione standard tali da ottenere concentrazioni diverse che comprendano nel loro intervallo la concentrazione incognita da determinare e alla quarta aliquota addizionare 9 mL di acqua. Aggiungere poi 1 mL di HCl concentrato, e portare al volume di 100 mL in matraccio tarato. Preparare anche un bianco dei reattivi. Aspirare le soluzioni ed il bianco, effettuare le letture di assorbanza, quindi sottrarre il valore del bianco da quello delle soluzioni. Riportare in un

grafico sull'asse delle ordinate i valori di assorbanza ottenuti ed in ascissa i valori di concentrazione delle soluzioni ottenuti dopo le aggiunte standard. La retta passante per i punti così individuati incontra l'asse delle ascisse in un punto (di valore negativo sul grafico) corrispondente alla concentrazione del campione in esame.

1.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurato, la concentrazione di Na^+ espressa in mg L^{-1} è data da:

$$Na^+ (mg\ L^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V}$$

dove:

a = concentrazione di sodio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
V = volume di campione (in mL) usato.

La concentrazione di Na^+ espressa in meq L^{-1} è data da:

$$Na^+ (meq\ L^{-1}) = \frac{a \cdot 100}{V \cdot 22{,}99}$$

dove:

a = concentrazione di sodio in mg L^{-1} ricavata dal grafico di taratura;
V = volume di campione (in mL) usato;
22,99 = peso equivalente del sodio.

1.7. Precisione ed accuratezza

La deviazione standard (determinata su un campione avente un valore medio misurato di 0,54 mg L^{-1}) è risultata ±0,08 mg L^{-1}. Su un campione contenente 0,5 mg L^{-1} si sono ottenuti recuperi superiori al 90%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

SOLFATI

1. Determinazione gravimetrica

1.1. Principio del metodo

Il solfato viene precipitato in ambiente acido per acido cloridrico come solfato di bario. La precipitazione viene eseguita ad una temperatura vicina a quella di ebollizione e, dopo un periodo di digestione, il precipitato viene filtrato, lavato con acqua esente da cloruri, seccato, calcinato e pesato come $BaSO_4$. Il metodo è applicabile per un intervallo di concentrazione di solfato compreso tra 100 e 200 mg L^{-1} alle acque naturali, salmastre e di scarico.

1.2. Interferenze e cause di errore

Interferisce la presenza di silice, di sostanze in sospensione e di sostanze insolubili che debbono essere eliminate. Per eliminare la silice, il campione viene evaporato fino a secchezza in una capsula di platino o anche di porcellana su di un bagno a sabbia. Si aggiunge 1 mL di acido cloridrico concentrato, si inclina la capsula e si ruota per consentire all'acido di venire a contatto con tutto il residuo; si continua l'evaporazione fino a secchezza. Si completa eventualmente l'essiccazione in stufa a 180°C. Si riprende con 2 mL di HCl e si ripete l'operazione. Si riprende con acqua e si filtra. L'analisi si esegue sul filtrato.

Interferiscono anche tutti quegli ioni che possono essere adsorbiti od occlusi nel precipitato. Se la concentrazione totale dei cationi nel campione è superiore a 250 mg L^{-1}, o se la concentrazione totale degli ioni di metalli pesanti è superiore 10 mg L^{-1}, per evitare fenomeni di coprecipitazione è consigliabile eliminare i cationi facendo fluire il campione in esame attraverso una colonna di resina cationica forte in forma acida, tipo Dowex 50.

Solfiti e solfuri possono interferire a seguito di un processo di ossidazione. In loro presenza occorre effettuare un'ossidazione preventiva con perossido d'idrogeno. In un'aliquota a parte si determina il contenuto di solfuri e solfiti che viene detratto.

1.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio.
- Crogiolo di porcellana.

1.4. Reattivi

Si debbono utilizzare solo reagenti puri per analisi. Per la preparazione dei reattivi è opportuno impiegare acqua bidistillata o deionizzata e distillata.

Soluzione di indicatore al metilarancio. Sciogliere 0,05 g di metilarancio in acqua e diluire a 100 mL.

Acido cloridrico diluito (1+1). Diluire l'acido cloridrico [HCl] (d = 1,19) con un ugual volume di acqua.

Soluzione di cloruro di bario. Sciogliere 100 g di cloruro di bario [$BaCl_2 \cdot 2 H_2O$] in un litro d'acqua.

Reattivo nitrato d'argento-acido nitrico. Sciogliere 8,5 g di nitrato d'argento [$AgNO_3$] e 0,5 mL di acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,40) in 500 mL di acqua.

Acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84).

Soluzione di perossido d'idrogeno [H_2O_2] al 30%.

1.5. Procedimento

Filtrare l'acqua in esame, se torbida, su filtro a filtrazione lenta. Prelevare un'aliquota d'acqua il cui contenuto di ione solfato sia di circa 40 mg. Aggiungere qualche goccia di indicatore al metilarancio e quindi acido cloridrico (1+1) fino a viraggio. Portare il volume a 200÷300 mL per diluizione con acqua o per evaporazione. Aggiungere ancora 2 mL di acido cloridrico (1+1). Riscaldare il campione

quasi all'ebollizione e sotto agitazione aggiungere lentamente la soluzione bollente di cloruro di bario fino a precipitazione completa. Aggiungere ancora altri 2 mL di soluzione di cloruro di bario a temperatura vicina all'ebollizione. Far digerire il precipitato bianco di solfato di bario a 80÷90°C, preferibilmente per una notte intera, ma comunque per non meno di due ore. Filtrare su filtro di carta per analisi quantitativa per filtrazione lenta e lavare il precipitato con acqua calda fino a che le acque di lavaggio siano praticamente esenti da cloruri (reattivo acido nitrico-nitrato d'argento). Seccare il filtro con il precipitato e trasferire il tutto in un crogiolo di porcellana portato a peso costante; carbonizzare il filtro lentamente, evitando che s'infiammi mantenendo il crogiolo inclinato. Calcinare quindi a 800°C per circa un'ora, avendo cura che il carbone sia completamente scomparso. Raffreddare in essiccatore e pesare fino a peso costante.

1.6. Espressione dei risultati

La concentrazione dello ione solfato, in mg L^{-1}, è data dall'espressione:

$$SO_4^{=} (mg\ L^{-1}) = \frac{\Delta P \cdot 411,6}{V}$$

dove:

ΔP = peso del solfato di bario in mg;
C = volume del campione di acqua espresso in mL.

1.7. Precisione ed accuratezza

La precisione espressa come coefficiente di variazione è dell'1% del contenuto di ione solfato nel campione.

2. Determinazione torbidimetrica

2.1. Principio del metodo

Lo ione solfato viene precipitato in ambiente acido per acido cloridrico con cloruro di bario. La sospensione omogenea di solfato di bario che in tal modo si forma viene stabilizzata per mezzo delle soluzioni di glicerina e cloruro di sodio. Con uno spettrofotometro o fotometro a filtri si misura l'assorbanza della sospensione e si risale alla concentrazione incognita mediante una curva di calibrazione ottenuta trattando quantità note di solfato nelle stesse condizioni del campione.
Il metodo è applicabile alle acque naturali, di scarico e salmastre. Esso è più rapido dei metodo gravimetrico e può essere impiegato in un intervallo di concentrazione compreso tra 10 e 50 mg L^{-1}. Si possono determinare concentrazioni inferiori a 10 mg L^{-1} utilizzando il metodo delle aggiunte standard.

2.2. Interferenze e cause di errore

Interferiscono sostanze in sospensione, sostanze colorate, sostanze organiche, elettroliti, se presenti ad elevate concentrazioni, silice, solfuri e solfiti.
Le sostanze in sospensione possono essere allontanate per filtrazione.
L'interferenza delle specie colorate o delle sostanze organiche disciolte può essere eliminata per filtrazione su colonna di carbone attivo.
Si può ovviare all'interferenza degli elettroliti effettuando la determinazione con il metodo delle aggiunte standard.
La solubilità del $BaSO_4$ rende critica la determinazione del solfato a concentrazioni inferiori a 10 mg L^{-1}, se non viene utilizzato il metodo delle aggiunte standard.

Per eliminare la silice, il campione viene evaporato fino a secchezza in una capsula di platino o anche di porcellana su di un bagno a sabbia. Si aggiunge 1 mL di acido cloridrico concentrato, si inclina la capsula e si ruota per consentire all'acido di venire a contatto con tutto il residuo; si continua l'evaporazione fino a secchezza. Si completa eventualmente l'essiccazione in stufa a 180°C. Si riprende con 2 mL di HCl e si ripete l'operazione. Si riprende con acqua e si filtra. L'analisi si esegue sul filtrato.

2.3. Apparecchiature

- Normale vetreria di laboratorio
- Spettrofotometro o fotometro a filtri adatto per misure fra 350 a 425 nm e vaschette con cammino ottico da 4 cm.

2.4. Reattivi

Tutti i reagenti debbono essere di grado analitico e l'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

Soluzione di glicerina (1+1). Mescolare un volume di glicerina con un volume uguale di acqua. La soluzione va preparata 24 ore prima di effettuare le analisi e non può essere conservata.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1, 19).

Soluzione di cloruro di sodio [NaCl]. Sciogliere 200 g di cloruro di sodio in acqua contenente 40 mL di HCl concentrato e portare a 1.000 mL con acqua.

Soluzione di glicerina e cloruro di sodio. Mescolare due volumi di soluzione di glicerina con un volume di soluzione di cloruro di sodio.

Soluzione di cloruro di bario [$BACl_2 \cdot 2H_2O$]. Sciogliere 90 g di cloruro di bario in 1.000 mL di acqua.

Soluzione standard di solfato [Na_2SO_4] (1 ml = 0,1 mg di $SO_4^{=}$). Pesare 0,1479 g di solfato di sodio anidro, previamente essiccato per un'ora in stufa a 110°C. Sciogliere in acqua e portare, in un matraccio tarato, a 1.000 mL con acqua.

2.5. Procedimento

2.5.1. Taratura

Prelevare 0 (bianco); 2; 5; 10; 15; 20; 25 mL di soluzione standard di solfato, portare a volume con acqua in matracci tarati da 50 mL.

Prelevare 30 mL di ciascuna soluzione e trasferirli in beute da 100 mL, introdurre una ancoretta magnetica e aggiungere 10 mL della soluzione di glicerina e cloruro di sodio. Si consiglia di utilizzare ancorette uguali per tutti i campioni. Iniziare l'agitazione, che va mantenuta costante ed uguale per tutte le analisi, e aggiungere 5 mL della soluzione di cloruro di bario. Continuare l'agitazione per 2 minuti, quindi lasciare a riposo il campione per 15 minuti. Agitare nuovamente per 15 secondi, versare le soluzioni nella vaschetta ed eseguire la lettura dell'assorbanza del campione rispetto al bianco allo spettrofotometro (420 nm) o ad un fotometro a filtri ad una lunghezza d'onda compresa nell'intervallo 350÷425 nm.

Riportare in grafico i valori di assorbanza misurati in corrispondenza dei mg di solfato delle soluzioni standard. Ripetere la calibrazione ogni volta che si analizzano dei campioni.

2.5.2. Dosaggio

Prelevare 30 mL di campione e trasferirli in una beuta da 100 mL. Introdurre un'ancoretta magnetica e aggiungere 10 mL della soluzione di glicerina e cloruro di sodio. Si consiglia di utilizzare ancorette uguali per tutti i campioni. Iniziare l'agitazione, che va mantenuta costante ed uguale per tutte le analisi, e aggiungere 5 mL della soluzione di cloruro di bario. Continuare l'agitazione per 2 minuti, quindi lasciare a riposo il campione per 15 minuti. Agitare nuovamente per 15 secondi, versare il campione nella vaschetta ed eseguire la lettura dell'assorbanza del campione rispetto al bianco allo spettrofotometro (420 nm) o ad un fotometro a filtri ad una lunghezza d'onda compresa nell'intervallo 350÷425 nm.

2.6. Espressione dei risultati

Dal valore di assorbanza misurato, la concentrazione di $SO_4^{=}$ espressa in mg L^{-1} è data da:

$$SO_4^{=}\ (\text{mg } L^{-1}) = \frac{P \cdot 1000}{V}$$

dove:

P = quantità di solfato in mg ricavata dal grafico di taratura;
V = volume di campione (in mL) analizzato.

2.7. Precisione ed accuratezza

L'accuratezza dipende dalla presenza di sostanze interferenti, oltre che dall'abilità dell'operatore. Quando non vi sono interferenze questo metodo consente una precisione del 5%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

SOLFURI

1. Determinazione volumetrica

1.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla titolazione indiretta dello ione solfuro con iodio e retro-titolazione dell'eccesso di iodio con tiosolfato.

Il metodo consente la determinazione del solfuro disciolto e del solfuro totale (disciolto e sospeso sotto forma di solfuro metallico) nelle acque naturali, salmastre e di scarico, nell'intervallo di concentrazione 1÷100 mg L^{-1}.

1.2. Interferenze e cause di errore

Il metodo può essere affrancato da eventuali interferenze trattando il campione con una soluzione di acetato di zinco e convogliando l'acido solfidrico, liberato in seguito ad acidificazione, nella soluzione standard di iodio.

1.3. Apparecchiatura

– Normale vetreria di laboratorio.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere deionizzata e distillata.

Soluzione di acetato di zinco 2 N. Sciogliere 220 g di acetato di zinco diidrato [$Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$] in acqua e portare a volume in matraccio tarato da 1.000 mL.

Acido solforico concentrato [H_2SO_4] (d = 1,84).

Acido cloridrico concentrato [HCl] d = 1,19).

Soluzione di iodio 0,025 N. Sciogliere 20÷25 g di ioduro di potassio [KI] in poca acqua e aggiungere 3,175 g di iodio [I_2]. Dopo che lo iodio si è disciolto diluire a 1.000 mL e titolare con tiosolfato di sodio 0,025 N usando salda d'amido come indicatore.

Soluzione di tiosolfato di sodio 0,025 N. Sciogliere 6,205 g di tiosolfato di sodio pentaidrato [$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$] in acqua fredda bollita di fresco, e diluire a 1.000 mL. La soluzione può essere stabilizzata con 5 mL di cloroformio o 0,4 g di NaOH.

Soluzione di bicromato di potassio 0,1 N. Sciogliere 4,9033 g di bicromato di potassio [$K_2Cr_2O_7$] seccato a 130°C in acqua e portare a volume di 1.000 mL.

Salda d'amido. Preparare in un mortaio un'emulsione di salda solubile (5÷6 g) con poca acqua e travasare il tutto in 1.000 mL di acqua bollente. Dopo qualche minuto di ebollizione, lasciare a riposo tutta una notte e quindi utilizzare il liquido limpido sovrastante, al quale come antifermentativo possono aggiungersi 1,25 g di acido salicilico o poche gocce di toluene.

Soluzione di cloruro di alluminio. Sciogliere 694 g di cloruro di alluminio esaidrato [$AlCl_3 \cdot 6H_2O$] (contenuto in recipiente sigillato, poiché il prodotto è molto igroscopico) in 1.000 mL di acqua.

Soluzione di idrossido di sodio 6 N. Sciogliere 24 g di idrossido di sodio [NaOH] in pasticche in acqua e diluire a 100 mL.

1.5. Procedimento

1.5.1. Titolazione del tiosolfato di sodio

Introdurre in un beaker 1÷2 g di ioduro di potassio [KI] sciogliendoli in poca acqua; aggiungere un volume misurato noto della soluzione di bicromato di potassio 0,1 N, 1 mL di acido solforico concentrato e attendere 6 minuti lasciando la soluzione al buio; diluire a 500÷600 mL e titolare con la soluzione di tiosolfato di sodio; il punto finale della titolazione è indicato dal passaggio del colore della soluzione dall'azzurro al verde chiaro; dal volume di soluzione di bicromato impiegato si risale al titolo della soluzione di tiosolfato.

1.5.2. Eliminazione delle sostanze riducenti
Aggiungere a 1.000 mL del campione di acqua 1,5 mL di soluzione di acetato di zinco 2 N e 1 mL di soluzione di idrossido di sodio 6 N. Aggiustare a pH 9 per ottenere la precipitazione dei solfuri come ZnS, filtrare il precipitato su filtro di vetro, recuperare il precipitato con acqua e portare il volume a 1.000 mL (volume originario) con acqua.

1.5.3. Determinazione del solfuro totale
Porre in una beuta da 500 mL un eccesso noto di iodio (1 mL di soluzione di iodio 0,025 N è equivalente a 0,4 mg di solfuro), e aggiungere, se necessario, acqua fino ad ottenere un volume di circa 20 mL.
Acidificare con 1 mL di acido cloridrico concentrato, tappare ed agitare; aggiungere 200 mL di campione. Se il colore dello iodio scompare aggiungere altro iodio. L'eccesso di iodio è retrotitolato con tiosolfato 0,025 N usando salda d'amido come indicatore. Al fine di ottenere una maggiore accuratezza, specie per piccole concentrazioni in solfuro, è opportuno fare una prova in bianco sui reagenti.

1.5.4. Determinazione del solfuro disciolto
Prima di procedere come descritto al punto 1.5.3. occorre separare per sedimentazione i solfuri sospesi facendoli flocculare per aggiunta di cloruro di alluminio e idrossido di sodio. Riempire pertanto con il campione una bottiglia da 1.000 mL, aggiungere 2 mL di soluzione di cloruro di alluminio, 2 mL di soluzione di idrossido di sodio e tappare in modo che non rimangano bolle di aria. Le quantità dei reagenti possono essere variate in base all'esperienza ma il loro rapporto deve rimanere costante. Agitare vigorosamente per almeno 1 minuto al fine di realizzare una flocculazione completa. Lasciare poi sedimentare fino a che il liquido sovrastante è ragionevolmente chiaro (in genere bastano 15 minuti); sifonare un volume opportuno di tale liquido che viene analizzato come precedentemente descritto.

1.5.5. Determinazione dell'acido solfidrico non ionizzato
Dalla determinazione del solfuro disciolto, noto il pH del campione originale, si può risalire facilmente alla concentrazione dell'acido solfidrico non ionizzato. La Tabella 1 consente di ottenere rapidamente questa concentrazione moltiplicando quella del solfuro disciolto per un fattore opportuno (la temperatura deve essere intorno ai 25°C).

Tabella 1 - Fattore di conversione per il calcolo della concentrazione di H_2S.

pH	Fattore	pH	Fattore	pH	Fattore
5,0	0,99	6,8	0,55	7,7	0,13
5,4	0,97	6,9	0,49	7,8	0,11
5,8	0,92	7,0	0,44	7,9	0,089
6,0	0,89	7,1	0,38	8,0	0,072
6,2	0,83	7,2	0,33	8,2	0,046
6,4	0,76	7,3	0,28	8,4	0,030
6,5	0,71	7,4	0,24	8,8	0,012
6,6	0,66	7,5	0,20	9,2	0,0049
6,7	0,61	7,6	0,16	9,6	0,0019

1.6. Espressione dei risultati

La concentrazione del solfuro totale o del solfuro disciolto in mg L^{-1} è data dalla formula seguente:

$$S^{=} (mg\ L^{-1}) = \frac{(a \cdot N_t - b \cdot N_T) \cdot 1600}{C}$$

dove:

$S^{=}$	=	concentrazione in solfuro;
a	=	volume (mL) di soluzione di iodio;
b	=	volume (mL) di soluzione di tiosolfato;
N_t	=	normalità della soluzione di iodio;
N_T	=	normalità della soluzione di tiosolfato;
C	=	volume (mL) di campione prelevato.

1.7. Precisione ed accuratezza

I dati di precisione ed accuratezza non sono attualmente disponibili.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).

ZINCO

1. Determinazione per assorbimento atomico (acque dolci)

1.1. Principio del metodo

Lo zinco viene determinato mediante spettrofotometria di assorbimento atomico, alla lunghezza d'onda di 213,8 nm.

Il metodo consente la determinazione dello zinco, disciolto o solubilizzabile con i trattamenti indicati in seguito, in campioni di acque naturali e di scarico, sia industriali che urbane, nell'intervallo di concentrazione di 0,01÷2 mg L^{-1} di Zn. L'intervallo che fornisce i risultati più attendibili è compreso tra 0,4 e 2 mg L^{-1}. Per concentrazioni superiori a 2 mg L^{-1} è possibile rientrare in detto intervallo ricorrendo a diluizione del campione.

1.2. Interferenze e cause di errore

Il ferro, se presente a concentrazioni superiori a 100 mg L^{-1}, deprime l'assorbimento dello zinco.
Sodio, potassio, solfati, cloruri (ciascuno a concentrazioni inferiori a 9 g L^{-1}) non interferiscono.
I nitrati non interferiscono fino a concentrazioni di 2 g L^{-1}.
Calcio e magnesio non interferiscono fino a concentrazioni di 4 mg L^{-1} ciascuno.
Cadmio, piombo, rame, nichel, cobalto, cromo (ciascuno fino a 10 mg L^{-1}) non danno interferenze.

1.3. Apparecchiature

Tra i vari sistemi proponibili per il lavaggio della vetreria risulta conveniente quello che impiega acido nitrico diluito caldo. Dopo il lavaggio è necessario un abbondante risciacquo con acqua.

- Normale vetreria di laboratorio.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato possibilmente di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di bruciatore standard per aria-acetilene e di tutti gli altri accessori necessari.

1.4. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere deionizzata e distillata.

Acido cloridrico concentrato [HCl] (d = 1,19).

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Acido nitrico diluito (1+199). Aggiungere 1 volume di HNO_3 concentrato a 199 volumi di acqua.

Soluzione standard concentrata di zinco (1,0 mL = 1,0 mg di Zn). Sciogliere 1,245 g di ossido di zinco [ZnO] in una soluzione contenente 10 mL di HNO_3 concentrato e 100 mL di acqua; diluire a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard diluita di zinco (1,0 mL = 0,1 mg di Zn). Diluire 100 mL della soluzione concentrata di zinco e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

Soluzione standard molto diluita di zinco (1,0 mL = 0,01 mg di Zn). Diluire 100 mL della soluzione standard diluita di zinco e 4 mL di HNO_3 concentrato a 1.000 mL con acqua.

1.5. Procedimento

Eseguire le operazioni consigliate nel manuale di istruzione dello strumento e selezionare la lunghezza d'onda di 213,8 nm.

1.5.1. Taratura

È opportuno effettuare il controllo della taratura all'inizio e alla fine di ogni ciclo di analisi. Se lo strumento lo consente, la lettura può essere effettuata direttamente in concentrazione.

1.5.1.1. Taratura per la determinazione dello zinco disciolto
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di zinco nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aspirare le soluzioni ed il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni dello zinco, espresse in mg L^{-1}, e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.1.2. Taratura per la determinazione dello zinco dopo trattamento con acido cloridrico
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di zinco nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido cloridrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare le soluzioni ed il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura, aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni dello zinco, espresse in mg L^{-1}, ed in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti del valore del bianco.

1.5.1.3. Taratura per la determinazione dello zinco dopo trattamento ripetuto con acido nitrico
Porre in diversi beaker rispettivamente 100 mL di almeno quattro soluzioni ottenute diluendo opportunamente la soluzione standard più conveniente con acido nitrico (1+199) e in un altro beaker acido nitrico (1+199) (bianco). La concentrazione di zinco nel campione deve risultare compresa tra i valori di concentrazione delle soluzioni impiegate per la taratura. Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare i beaker e aggiungere altri 5 mL di acido nitrico. Coprire i beaker con vetrini da orologio e ripetere il trattamento lo stesso numero di volte necessario per ottenere la digestione completa del campione (ciò è indicato da un residuo debolmente colorato). Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti del beaker ed i vetrini da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matracci tarati. Aspirare quindi le soluzioni ed il bianco ed effettuare la lettura delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per 10÷15 secondi. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni dello zinco, espresse in mg L^{-1}, ed in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza corretti dal valore del bianco.

1.5.2. Determinazione

1.5.2.1. Determinazione dello zinco disciolto
Filtrare il campione subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 μm ed aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro di campione.
Porre in un beaker 100 mL di campione e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). Aspirare il campione ed il bianco ed effettuare le letture delle assorbanze. Intervallare ogni misura aspirando la soluzione di acido nitrico diluito per circa 10÷15 secondi. Leggere l'assorbanza del campione corretta dell'assorbanza del bianco.

1.5.2.2. Determinazione dello zinco dopo trattamento con acido cloridrico
Filtrare il campione subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 μm ed aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro di campione.
Porre in un beaker 100 mL di campione e in un altro beaker 100 mL di acido nitrico (1+199) (bianco). Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido cloridrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su pia-

stra fino a che il volume si sia ridotto a 15÷20 mL evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare e trasferire la soluzione in un matraccio da 100 mL. Portare a volume con acqua. Aspirare la soluzione ed il bianco ed effettuare la lettura dell'assorbanza. corretta del valore del bianco.

1.5.2.3. Determinazione dello zinco dopo trattamento ripetuto con acido nitrico
Filtrare il campione subito dopo il prelievo attraverso una membrana con pori di 0,45 µm ed aggiungere 5 mL di acido nitrico concentrato per ogni litro di campione.
Porre in un beaker 100 mL di campione e in un altro beaker acido nitrico (1+199) (bianco). Aggiungere in ogni beaker 5 mL di acido nitrico concentrato. Scaldare su bagno ad acqua o su piastra fino quasi a secchezza evitando che l'evaporazione sia violenta. Raffreddare i beaker ed aggiungere altri 5 mL di acido nitrico. Coprire i beaker con vetrini da orologio e ripetere il trattamento fino ad ottenere la digestione completa del campione (ciò è indicato da un residuo debolmente colorato). Aggiungere 1÷2 mL di acido nitrico concentrato e scaldare per sciogliere il residuo. Lavare le pareti del beaker ed i vetrini da orologio con acqua e portare a volume di 100 mL in matracci tarati. Aspirare quindi la soluzione ed il bianco ed effettuare la lettura dell'assorbanzea corretta del valore del bianco.

1.6. Espressione dei risultati
Dal valore di assorbanza misurato e corretto del valore del bianco, attraverso il grafico di taratura, si risale alla concentrazione di zinco nel campione in esame espressa in mg L^{-1}.

1.7. Precisione ed accuratezza
Prove effettuate da sette differenti laboratori su campioni di acque di scarico prima e dopo aggiunta di quantità note di zinco (in modo da ottenere campioni con concentrazione di circa 0,5 mg L^{-1}) hanno dato valori della deviazione standard relativa compresi tra 0,9 e 3,1%, e recuperi relativi delle quantità aggiunte compresi tra il 97 e il 100%.

2. Determinazione per assorbimento atomico (acque marine e salmastre)

2.1. Principio del metodo
Il metodo si basa sulla formazione di un complesso tra lo zinco e una miscela chelante costituita da pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) e dietilditiocarbammato di dietilammonio (DDDC) ad un determinato pH. La fase organica, ottenuta successivamente per estrazione del complesso con freon TF (noto anche come frigen 113), viene retro-estratta in fase acquosa e successivamente aspirata direttamente nella fiamma aria-acetlene di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 214 nm.

2.2. Interferenze e cause di errore
La presenza di altri metalli pesanti fino ad un totale complessivo di 30 mg L^{-1} non interferisce.
La maggior parte delle interferenze è dovuta a sostanze non complessabili dalla miscela chelante, eventualmente presenti nella matrice, e viene eliminate con l'estrazione.

2.3. Apparecchiature
- Normale vetreria di laboratorio. Tutta la vetreria impiegata deve essere lavata con acido nitrico diluito (1+9) caldo e accuratamente risciacquata con acqua. Effettuare questa operazione immediatamente prima di ciascun uso.
- Spettrofotometro di assorbimento atomico munito di dispositivo per la correzione automatica dell'assorbimento non specifico, di lampada HCL per lo zinco, di autocampionatore e di tutti gli altri indispensabili accessori.
- pH-metro corredato di una coppia di elettrodi vetro calomelano.

2.4. Reattivi

I reattivi, devono essere di grado ultrapuro per analisi. L'acqua distillata o deionizzata deve essere ulteriormente purificata (ECw ≤ 0.1 µS cm^{-1}).

Acido nitrico concentrato [HNO_3] (d = 1,42).

Acido nitrico diluito 1 M. [HNO_3].

Ammoniaca concentrata [$NH_4(OH)$].

Agente chelante. Soluzione di pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) e di dietilditiocarbammato di dietilammonio (DDDC). Sciogliere 2 g di APDC e 2 g di DDDC in 100 mL di acqua. La soluzione deve essere purificata con ripetute estrazioni con freon fino a che la lettura dei bianchi sia trascurabile. Conservare la soluzione APDC/DDDC in frigorifero a 4 °C. Preparare la soluzione giornalmente.

Soluzione tampone. Preparare una soluzione acquosa al 10% di citrato ammonico bibasico [$(NH_4)_2HC_6H_5O_7$] e purificare la soluzione con ripetute estrazioni carbammato/freon (p.e. 1 mL di soluzione al 2% di APDC/DDDC per 250 mL di soluzione tampone, estratta 2 volte con 20 mL di freon).

Freon TF. [1,1,2-tricloro-1,2,3-trifluoroetano (noto anche come frigen 113), d = 1,565 a 25°C, punto di ebollizione 47,6°C]. Il reagente deve essere ridistillato e preferibilmente conservato in un recipiente di quarzo.

Soluzione standard di zinco. Dalla soluzione madre di Zn (1 mL = 1 mg) reperibile in commercio (prodotto puro per assorbimento atomico) preparare, per diluizione, standard diluiti da 0,1 mg L^{-1} a 0,001 mg L^{-1} (pH 2) in relazione alla concentrazione dei campioni. Soluzioni standard con concentrazioni inferiori a 1 mg L^{-1} devono essere preparate giornalmente.

2.5. Procedimento

2.5.1. Taratura

Preparare un grafico di taratura con un bianco costituito da HNO_3 1 M e almeno tre punti diluendo opportunamente lo standard acquoso con HNO_3 1 M. Effettuare le lettura allo spettrofotometro ad assorbimento atomico e tracciare il grafico di taratura ponendo in ascisse le concentrazioni di Zn e in ordinate le assorbanze corrispondenti corrette del valore del bianco.

2.5.2. Analisi del campione

Trasferire 100 mL (o più) del campione di acqua in un imbuto separatore da 250 mL. Aggiustare il pH a circa 4,5 con l'aggiunta di 1 mL di soluzione tampone (se il campione è stato preventivamente acidificato per lo stoccaggio, il pH richiesto deve essere aggiustato con ammoniaca concentrata successivamente all'aggiunta della soluzione tampone).

Addizionare quindi 1 mL di agente chelante seguito da 20 mL di freon. Agitare vigorosamente per 2 minuti. Lasciar separare le fasi per 15 minuti e raccogliere lo strato inferiore organico in un imbuto separatore di teflon. Assicurarsi che la fase organica costituita dal freon sia completamente esente dall'acqua campione (eventuali bolle di acqua sulla superficie del freon sono facilmente visibili e possono essere rimosse con l'aiuto di una micropipetta). Continuare la procedura aggiungendo altri 10 mL di freon nell'imbuto separatore da 250 mL e agitare di nuovo vigorosamente per 2 minuti.
Riunire i due estratti e aggiungere 0,5 mL di HNO_3 concentrato con una micropipetta. Dopo aver agitato per 1 minuto, lasciare a riposo per 15 minuti per decomporre i carbammati metallici. Aggiungere 3,5 mL di acqua e agitare per 2 minuti per assicurare la retroestrazione. Dopo che le fasi si sono separate, scartare la fase inferiore (freon). Trasferire i 4 mL della fase acida contenenti il metallo retroestratto in un beaker di quarzo o teflon da 10 mL e lavare due volte l'imbuto separatore con 1 mL di HNO_3 1 M.
Evaporare a secco sotto cappa su piastra riscaldante l'estratto totale di 6 mL. Ridisciogliere il residuo nel beaker con due frazioni da 0,5 mL di HNO_3 1 M caldo e trasferirlo in un beaker idoneo per una lettura immediata allo spettrofotometro. Nei casi in cui lo zinco assume concentrazioni troppo alte, al di fuori dell'intervallo ottimale dello strumento, il volume finale di 1 mL deve essere opportunamente diluito con HNO_3 1 M.
Misurare l'assorbanza a 214 nm.

2.6. Espressione dei risultati

Dal valore dell'assorbanza, corretta dell'assorbanza del bianco, tramite il grafico di taratura, e tenendo conto del fattore di concentrazione si risale alla concentrazione del metallo nel campione espressa in $\mu g\ L^{-1}$.

2.7. Precisione ed accuratezza

La precisione del metodo è stata verificata con otto ripetizioni di un campione di acqua di mare con una concentrazione di 0,35 $\mu g\ L^{-1}$ di Zn, ottenendo un coefficiente di variazione inferiore al 10%.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*, Quaderno 100 (Roma).
GRASSHOFF K., EHRHARDT M. KREMLING K. (1983), *Methods of Seawater Analysis*, II Ed. Verlag. Chemie.

PARAMETRI MICROBIOLOGICI

GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI

1. Introduzione

I contaminanti biologici nelle acque rivestono una particolare importanza per le possibili conseguenze sulla salute dell'uomo e/o degli animali. Tra essi sono compresi gli organismi capaci di produrre malattie (patogeni e opportunisti patogeni). Infatti, la quasi totalità delle patologie infettive trasmesse per via idrica è imputabile a microrganismi capaci di causare malattie ad esclusiva o prevalente localizzazione intestinale; essi vengono eliminati con le feci di individui infetti, possono raggiungere l'ambiente idrico e, attraverso differenti modalità, possono infettare e dare origine a patologie in altri soggetti, garantendo, in tal modo, la circolazione (circuito fecale-orale) dei patogeni. Nelle acque vengono a ritrovarsi anche quei microrganismi generalmente di per sé non patogeni, ma la cui presenza nell'ambiente idrico costituisce un indice indiretto e teorico della eventuale contemporanea presenza di patogeni. Essi costituiscono il gruppo dei microrganismi indicatori di contaminazione fecale, la cui ricerca ha valenza sanitaria nel giudizio di qualità igienica dell'ambiente idrico.
L'approfondimento clinico delle patologie a circuito fecale-orale ha messo a disposizione strumenti utili, mutuati dall'esperienza effettuata in campo ospedaliero e solo successivamente traslati alla ricerca degli stessi microrganismi dispersi nell'ambiente, dove, compresenza con altri microrganismi di derivazione non enterica e adsorbimento su solidi sospesi comportano però difficoltà analitiche non evidenziabili nel corso di esami più prettamente clinici.
La ricerca di microrganismi indicatori di contaminazione fecale costituisce la parte largamente prevalente dell'esame microbiologico delle acque ed è quella universalmente praticata. Ciò è dovuto essenzialmente a motivi di ordine pratico, legati alla relativa semplicità della ricerca dei microrganismi indicatori a fronte della ricerca dei patogeni. Pertanto la ricerca degli indicatori di contaminazione fecale nelle acque è da sempre utilizzata in alternativa a quella diretta dei patogeni, a causa delle difficoltà tecniche di rilevamento di questi ultimi, legate principalmente alla sensibilità dei metodi e ai tempi lunghi di risposta delle analisi.
L'esame microbiologico delle acque si basa essenzialmente sulla possibilità di coltivare su idonei substrati, ed in specifiche condizioni di temperatura di incubazione, i batteri contenuti nell'acqua in esame, utilizzando particolari metodologie finalizzate all'individuazione differenziale di gruppi microbici o di specie che si ritengono significativi ai fini del giudizio igienico e/o di qualità dell'acqua in esame.
Il metodo più tradizionale (Presenza/Assenza) si basa sulla semina e incubazione, in idonei terreni di coltura liquidi, di aliquote del campione da analizzare. Dopo incubazione la presenza o l'assenza del microrganismo ricercato viene messa in evidenza in base della eventuale variazione subita dal terreno insemenzato (intorbidimento, cambiamento di colore, produzione di gas, ecc.).
Una variante introdotta da tempo nel metodo tradizionale è costituita dalla semina di quantità scalari del campione al fine di pervenire ad una stima probabilistica del numero di microrganismi presenti (metodo MPN o del numero più probabile o dei tubi multipli). Tuttavia questo metodo presenta dei limiti di ripetibilità e precisione se vengono effettuati inoculi del campione in numero limitato.
Un altro metodo, quello della filtrazione su membrana (MF), consente di rilevare direttamente (per conta diretta) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato. Su una membrana, attraverso cui è stata filtrata l'acqua da analizzare, posta su specifici terreni solidificati all'agar, si conta il numero delle colonie sviluppate dopo opportuna incubazione.
Di seguito si descrivono le procedure standard per l'applicazione dei due metodi più comunemente utilizzati: metodo MPN (del numero più probabile o dei tubi multipli) e il metodo della filtrazione su membrana (MF).

2. Metodo A: Metodo dei tubi multipli o del numero più probabile (MPN)

Il metodo dei tubi multipli fornisce una stima statistica della concentrazione batterica nel campione analizzato. Si basa infatti sulla combinazione dei tubi o dei pozzetti positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi o dei pozzetti insemenzati con l'acqua in esame: più elevato è il numero degli inoculi effettuati, maggiore è la precisione del metodo.
Il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas:

$$\text{MPN/100 mL} = \frac{\text{N° di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{mL di campione nei tubi negativi} \cdot \text{mL di campione in tutti i tubi}}}$$

Il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, da una apposita tabella già predisposta (Tabella 1). Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti di confidenza, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei batteri.
Questo metodo, da considerarsi comunque scarsamente preciso, può essere impiegato come alternativo a quello della filtrazione su membrana nei casi in cui si analizzi acqua con particolato in sospensione e comunque con valori superiori a 1 unità nefelometrica di torbidità (NTU). I volumi di acqua che possono essere esaminati sono tuttavia limitati in considerazione delle difficoltà tecniche di preparazione e distribuzione di aliquote elevate del campione di acqua da analizzare.

Tabella 1 - Indice MPN e limite di confidenza al 95% per varie combinazioni di risultati positivi quando serie di 3 o 5 tubi vengono inoculati con diluizioni di 10 mL, 1 mL, 0,1 mL

DILUIZIONI						
Combinazioni di tubi positivi	**3 TUBI INDICE MPN/100mL**	**LIMITI DI CONFIDENZA AL 95%**		**5 TUBI INDICE MPN/100mL**	**LIMITI DI CONFIDENZA AL 95%**	
		inferiore	**superiore**		**inferiore**	**superiore**
0-0-0	< 3			< 2		
0-0-1	3	< 0.5	9	2	< 0.5	7
0-1-0	3	< 0.5	13	2	< 0.5	7
0-2-0				4	< 0.5	11
1-0-0	4	< 0.5	20	2	< 0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	< 0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	< 0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	< 0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	< 0.5	15
2-0-0	9	1	36	4	< 0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150			
2-3-0				12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380			

Tabella 1 *(segue)*

Combinazioni di tubi positivi	DILUIZIONI 3 TUBI INDICE MPN/100mL	LIMITI DI CONFIDENZA AL 95%		5 TUBI INDICE MPN/100mL	LIMITI DI CONFIDENZA AL 95%	
		inferiore	superiore		inferiore	superiore
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380			
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470			
3-3-0	240	36	1300			
3-3-1	460	71	2400			
3-3-2	1100	150	4800			
3-3-3	≥2400					
4-0-0				13	3	31
4-0-1				17	5	46
4-1-0				17	5	46
4-1-1				21	7	63
4-1-2				26	9	78
4-2-0				22	7	67
4-2-1				26	9	78
4-3-0				27	9	80
4-3-1				33	11	93
4-4-0				34	12	93
5-0-0				23	7	70
5-0-1				31	11	89
5-0-2				43	15	110
5-1-0				33	11	93
5-1-1				46	16	120
5-1-2				63	21	150
5-2-0				49	17	130
5-2-1				70	23	170
5-2-2				94	28	220
5-3-0				79	25	190
5-3-1				110	31	250
5-3-2				140	37	340
5-3-3				180	44	500
5-4-0				130	35	300
5-4-1				170	43	490
5-4-2				220	57	700
5-4-3				280	90	850
5-4-4				350	120	1000
5-5-0				240	68	750
5-5-1				350	120	1000
5-5-2				540	180	1400
5-5-3				920	300	3200
5-5-4				1600	640	5800
5-5-5				≥2400		

2.1 Procedura

Inoculare diluizioni scalari del campione in esame o di una sua diluizione, in triplice, in 3÷5 serie di tubi ciascuna contenenti terreno colturale liquido. Più comunemente si seminano 10, 1 e 0,1 mL dell'acqua in esame. Quando il campione ha una bassa carica microbica è necessario analizzare volumi maggiori. In questo caso, da una semina di 100, 10 e 1 mL si otterrà un valore dell'indice MPN ricavato dalla tabella che dovrà essere moltiplicato per 0,1. Se, d'altra parte, le quantità seminate saranno 1; 0,1 e 0,01 mL, il valore riportato in Tabella 1 dovrà essere moltiplicato per 10, oppure per 100, se le aliquote seminate saranno di 0,1; 0,01 e 0,001 mL.
Per il calcolo del valore dell'indice MPN, anche nel caso in cui siano state utilizzate cinque serie di tubi, si calcola comunque sulla base delle tre serie più significative. Per selezionare le tre serie rappresentative, si individua quella con l'inoculo più basso in cui tutti e cinque i tubi sono risultati positivi e le due serie successive con gli inoculi di aliquote scalari più basse. Inoltre, nel caso in cui, oltre alle tre serie di tubi considerate, ne esiste una quarta con qualche tubo positivo, il numero dei tubi positivi di quest'ultima si somma al numero dei tubi positivi della serie immediatamente precedente.
La procedura prevede, in alcuni casi, lo svolgimento di una prova presuntiva e di una prova di conferma. In questo caso, il risultato si ottiene contando il numero dei tubi positivi ottenuti dopo la semina nel terreno utilizzato per la prova di conferma; in corrispondenza della tripletta di combinazioni positive, si ricava dalla Tabella 1, il valore dell'indice MPN/100 mL di campione.

3. Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF)

La metodica della filtrazione su membrana si adatta a tutti i tipi di acqua. Per le acque particolarmente torbide la sua applicazione è limitata qualora il campione debba essere analizzato tal quale; in questo caso, l'analisi di diluizioni del campione ne consente tuttavia l'uso senza difficoltà. La tecnica permette di ottenere risultati in tempi più brevi rispetto a quelli richiesti con il metodo dei tubi multipli (MPN). Inoltre presenta diversi vantaggi semplificando notevolmente le procedure di laboratorio e abbreviandone i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione.
La procedura permette di contare i microrganismi, presenti in un campione di acqua, che hanno formato colonie sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura. Il numero di colonie ottenuto si riporta come "Unita' Formanti Colonia" (UFC) riferito ad un volume specifico, in genere 100 mL. Il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato si ottiene dalla seguente equazione:

$$\text{UFC/100 mL} = \frac{\text{N° delle colonie contate} \cdot 100}{\text{mL di campione filtrati}}$$

3.1. Procedura

Utilizzare membrane quadrettate sterili, di esteri di cellulosa, con diametro di 47÷50 mm e con porosità nominale di 0,45 µm di diametro. Dopo avere adeguatamente agitato il campione di acqua o l'eventuale sua diluizione, prelevare il volume di campione prestabilito e filtrare attraverso una membrana utilizzando una pompa da vuoto o una pompa ad acqua.
Disporre quindi la membrana o su dischi assorbenti imbevuti di terreno colturale liquido o su terreno di coltura agarizzato; il passaggio per capillarità, attraverso i pori della membrana, dei principi nutritivi del terreno permette lo sviluppo di colonie batteriche sulla superficie della membrana stessa, dopo un idoneo periodo di incubazione alla temperatura fissata.

4. Modalità di campionamento e trasporto dei campioni

Una corretta metodologia di campionamento e di trasporto dell'acqua da analizzare costituisce il presupposto indispensabile al fine di ottenere risultati analitici attendibili. Modalità non corrette di prelievo e di trasporto possono essere causa di errori analitici anche più sensibili di quelli legati a non corrette tecniche di laboratorio.

Il campione raccolto deve essere quanto più possibile rappresentativo al fine di fornire dati utili alla individuazione delle caratteristiche di qualità dell'acqua da esaminare.
Il prelievo dei campioni per l'esame microbiologico deve essere sempre effettuato con recipienti sterili e seguendo le usuali norme di asepsi. Per il campionamento di acque particolarmente inquinate è necessario l'impiego di cautele igieniche a salvaguardia dell'operatore (guanti, ecc.).
All'atto del prelievo, la bottiglia sterile dovrà essere aperta avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo della bottiglia e si dovrà provvedere all'immediata chiusura della stessa subito dopo il prelievo. Le bottiglie utilizzate per prelevare campioni per analisi microbiologiche, non devono mai essere sciacquate all'atto del prelievo. Nel caso in cui l'acqua da esaminare contenga cloro, le bottiglie dovranno contenere una soluzione al 10% di sodio tiosolfato, nella quantità di 0,1 mL per ogni 100 mL di capacità della bottiglia, aggiunto prima della sterilizzazione del recipiente utilizzato per il prelievo. La presenza di tiosolfato, nelle quantità indicate, non interferisce con i risultati delle analisi microbiologiche. È opportuno che, in questi casi, venga effettuata, al momento del prelievo, la determinazione della concentrazione di cloro attivo.
Per i prelievi da effettuare per immersione della bottiglia si dovranno usare bottiglie incartate prima della sterilizzazione e la pinza o altro sistema idoneo dovranno essere sterilizzati alla fiamma prima dell'uso. Al momento del prelievo la bottiglia sarà afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema, previa apertura del tappo, e sarà immersa nell'acqua da prelevare e richiusa con le usuali cautele di asepsi.
Nell'eseguire prelievi per l'esame microbiologico, si dovrà sempre avere cura di non riempire completamente la bottiglia al fine di consentire una efficace agitazione del campione, in laboratorio, al momento dell'analisi.
Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua, la precisa annotazione del punto in cui si è effettuato il prelievo e dovranno altresì essere trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni relative alle eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio.
Tutti i campioni di acqua, indipendentemente dalla loro natura, devono essere esaminati nel minore tempo possibile, preferibilmente entro le 6 ore dal prelievo e comunque entro un massimo di 24 ore. Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Al fine di consentire il mantenimento della temperatura richiesta è necessario usare contenitori termoisolanti (borse termiche) utilizzando apposite piastre frigorifere del commercio, o ghiaccio di acqua, avendo comunque cura di evitare il congelamento dell'acqua contenuta. Durante il trasporto le bottiglie dovranno essere collocate nel contenitore in modo da impedire il loro rovesciamento e, fra le bottiglie, dovranno essere collocati idonei sistemi di separazione per evitare rotture.

5. Parametri microbiologici

Dalla difficoltà di utilizzare di routine tecniche finalizzate alla ricerca di tutti i possibili microrganismi è sorta la necessità di ricercare, per la definizione della qualità di un'acqua, microrganismi indicatori di contaminazione, la cui presenza può essere un indice teorico della presenza di patogeni. È evidente che l'unico controllo microbiologico efficace sarebbe costituito dalla ricerca dei patogeni (batteri patogeni, virus e parassiti). Diverse difficoltà pratiche si oppongono però all'adozione routinaria di tale tipo di indagini nel controllo delle acque. Tuttavia, in casi particolari e disponendo di laboratori sufficientemente attrezzati, può essere opportuno effettuare la ricerca dei patogeni e in primo luogo degli enterobatteri patogeni (*Salmonella* spp., *Vibrio* spp.).
La ricerca dei patogeni deve essere effettuata su quantitativi relativamente elevati del campione di acqua da analizzare, ma, mentre il loro rilevamento testimonia ovviamente della loro sicura presenza, non si può dire che un risultato negativo deponga sicuramente per la loro assenza. Infatti i patogeni

possono essere presenti con discontinuità negli effluenti e conseguentemente nei corpi idrici riceventi; in aggiunta, l'abbondante presenza di flora contaminante accessoria interferisce spesso con la reale possibilità di evidenziare i patogeni anche quando essi siano presenti.
Pertanto, a causa della discontinuità della loro presenza e delle difficoltà tecniche legate al loro isolamento nell'ambiente idrico, la ricerca dei patogeni non potrà tanto avere il significato di controllare la qualità delle acque, quanto finalità epidemiologiche, offrendo la possibilità di individuare uno degli anelli della catena attraverso la quale avviene la diffusione degli agenti patogeni responsabili delle malattie infettive di origine idrica.
I microrganismi considerati indicatori di inquinamento fecale sono invece più uniformemente diffusi e presenti nell'ambiente idrico. Essi vengono ricercati comunemente per la definizione della qualità di acque di diversa tipologia e a diversa destinazione d'uso. Le loro densità nelle acque sono variabili a seconda del grado di contaminazione cui è soggetto il corpo idrico. Pertanto, i volumi di acqua da analizzare per il rilevamento dei microrganismi indicatori nei diversi casi possono variare da 1 mL di una diluizione del campione a 100 mL del campione tal quale. In ogni caso il valore numerico ottenuto dall'analisi deve essere riportato al volume di 100 mL.
Nelle acque reflue le concentrazioni (indicative) dei microrganismi, riferite a 100 mL di acqua, sono quelle riportate di seguito:

coliformi totali	$10^7 \div 10^9$
coliformi fecali	$10^5 \div 10^7$
streptococchi fecali	$10^4 \div 10^6$
enterobatteri patogeni	$10^2 \div 10^3$
enterovirus	$10 \div 10^3$

Pertanto i volumi da analizzare potranno variare principalmente in base alla qualità dell'acqua che si va ad esaminare e al gruppo di microrganismi che si va a ricercare considerando la possibilità di procedere ad eventuali diluizioni del campione in esame.
Di seguito verranno descritti i metodi di rilevamento per i microrganismi indicatori di contaminazione fecale (*Escherichia coli, Coliformi fecali* e *Streptococchi fecali*) e per i coliformi totali che, sebbene presenti nel materiale fecale di origine umana ad una concentrazione media di 10^9 UFC/g, sono però, indipendentemente dall'azione antropica, anche largamente presenti nel suolo, sulle piante e comunque nell'ambiente acquatico.
La ricerca di questi microrganismi nelle acque viene di routine effettuata mediante le metodiche che permettono di quantificarli in base alle tecniche descritte in precedenza.
Verranno riportate anche le procedure per lo svolgimento dei metodi semi-quantitativi per l'isolamento degli enterobatteri patogeni, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. Le tecniche descritte forniscono una risposta relativa alla presenza o assenza del microrganismo ricercato e non un valore numerico. Infatti, la ricerca di questi patogeni secondo le metodiche quantitative comporterebbe costi troppo elevati per materiale e attrezzature da utilizzare e tempi lunghi per l'ottenimento dei risultati.
Inoltre, verranno descritte le procedure analitiche relative alla ricerca di cisti e oocisti di protozoi patogeni (*Giardia* e *Cryptosporidium*) e alla determinazione delle uova di Elminti. Saranno anche descritti i metodi per la determinazione di agenti virali, quali gli enterovirus e i batteriofagi anti-*Escherichia coli*.

Bibliografia

CNR-IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque*. Quaderno 100 (Roma).
CLARK H.F., GELDREICH E.E., JETER H.L. and KABLER P.W. (1951), *The membrane filter in sanitary bacteriology.* Publ. Health Rep. 66:951.
DALLA VALLE J.M. (1941), *Notes on the most probable number index as used in bacteriology.* Publ. Health Rep. 56:299.

COLIFORMI TOTALI

1. Introduzione

I microrganismi indicati con il termine di coliformi totali vengono compresi nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*. L'appartenenza a questa famiglia da parte di generi differenti, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento, che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35°C in 48 ore.
I coliformi totali sono batteri a forma di bastoncello, gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni. Sono considerati, insieme ai coliformi fecali e agli streptococchi fecali, classici indicatori di contaminazione nelle acque. Pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10^9 UFC/g, sono ubiquitari. Infatti, sono largamente diffusi anche nell'ambiente colonizzando suolo, acqua e vegetazione. Nelle acque reflue grezze le loro concentrazioni possono raggiungere valori compresi tra $10^7 \div 10^9$/100 mL di campione.
A causa della loro costante presenza nell'ambiente, la loro validità come indicatori è stata più volte messa in dubbio. Una delle più recenti classificazioni distingue i microrganismi appartenenti al gruppo in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenzia coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione.
I metodi proposti consentono di valutare il numero dei microrganismi presenti in un determinato volume di acqua reflua. Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (*TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI*). Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.

Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati tre substrati alternativi.

2. Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

2.1. Volume da analizzare

Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

2.3. Reagenti e Terreni di coltura*

2.3.1 Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

Brodo Lattosato

Composizione:	Estratto di carne	3	g
	Peptone	5	g
	Lattosio	5	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,9± 0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

Brodo al Lauril Triptosio

Composizione:	Triptosio	20	g
	Lattosio	5	g
	Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
	Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
	Sodio cloruro	5	g
	Sodio lauril solfato	0,1	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,8±0,2		

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato. Si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.3.2. Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

Brodo Lattosato Bile Verde Brillante

Composizione:	Peptone	10	g
	Lattosio	10	g
	Bile	20	g
	Verde brillante	13,3	mg
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,2± 0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno nei tubi contenenti la campanella di Durham rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.4. Procedura

2.4.1. Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva, agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 min. Incubare a 35±1°C. Dopo 24±2 h agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 h. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48±3 h costituisce una reazione positiva presuntiva. Sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

2.4.2. Prova di conferma
Prelevare, sterilmente, un'ansata o 1 mL di brodocoltura dai un tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 h) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo lattosato bile verde brillante per la prova di conferma. Incubare i tubi a 36± 1°C per 24+24 h. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi totali.
Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute *(TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI)*, calcolare il valore dell'indice MPN.

2.5. Espressione dei risultati
Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione tenendo in considerazione le eventuali diluizioni effettuate.

3. Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF)
Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi totali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche. Di seguito vengono proposti tre substrati di isolamento alternativi, idonei al rilevamento dei coliformi totali nelle acque reflue.

3.1. Volume da analizzare
Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3.2. Strumentazione e vetreria
Normale attrezzatura di laboratorio.

3.3. Reagenti e Terreni di coltura*

3.3.1. Terreni di isolamento

M-Endo agar.

Composizione:	Estratto di lievito	1,2	g
	Casitone	3,7	g
	Tiopeptone	3,7	g
	Triptosio	7,5	g
	Lattosio	9,4	g
	Potassio diidrogeno fosfato	1,0	g
	Dipotassio idrogeno fosfato	3,3	g
	Sodio cloruro	3,7	g
	Sodio desossicolato	0,1	g
	Sodio lauril solfato	0,05	g
	Sodio solfuro	1,6	g
	Fucsina basica	0,8	g
	Agar	15,0	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,2±0,2		

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

Il terreno è classificato come Xn - Nocivo. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che la presenza di fucsina basica (Magenta I) comporta la possibilità di effetti irreversibili (R40) e il prodotto può presentare un rischio di cancerogenesi (categoria 1). Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).
Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizza. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata contenente 20 mL di etanolo al 95%, si distribuisce in capsule di Petri. È preferibile preparare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce.
L'uso di questo substrato può comportare che coliformi danneggiati dai trattamenti che l'acqua ha subito non vengano rilevati e può permettere la crescita di microrganismi diversi da quelli ricercati. Pertanto può accadere che colonie rosse tipiche non siano formate da microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali, così come colonie atipiche possano originare da batteri coliformi. Pertanto, è consigliabile, qualora sorgano dubbi sulla natura delle colonie, sottoporre le colonie sospette a prove di conferma.

Substrato cromogeno agarizzato I

Composizione:	Triptosio	10	g
	Triptofano	1	g
	Peptocomplesso	5	g
	Estratto di lievito	3	g
	Sodio cloruro	5	g
	Sali di bile n. 3	1,5	g
	IPTG	0,1	g
	5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
	4-metilumbelliferil-ß-D-glucuronide	0,05	g
	Agar Bios LL	13	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare, distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane.

Substrato cromogeno agarizzato II

Composizione:	Miscela cromogenica	20,3	g
	Estratto di lievito	3	g
	Peptone	5	g
	Lattosio	2,5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Sodio fosfato monoacido	3,5	g
	Potassio fosfato biacido	1,5	g
	Rosso neutro	0,03	g
	Agar	15	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare, distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane.

3.3.2. Substrato di crescita
Agar soia triptone

Composizione:			
	Triptone	15	g
	Peptone di soia	5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Agar	20	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare, distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane.

3.3.3. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato
Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

3.4. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 36± 1°C per 18÷24 h.
Dopo incubazione, sul terreno *M-Endo agar* la lettura dei risultati deve essere effettuata al più presto allo scopo di evitare che la luce provochi alterazioni cromatiche delle colonie cresciute. Sono da considerare coliformi totali le colonie cresciute entro le 24 h, di colore rosso con riflesso verde metallico.
Sul *substrato cromogeno agarizzato I* sono considerate coliformi totali le colonie di colore verde-blu cresciute entro le 24 h.
Sul *substrato cromogeno agarizzato II* sono considerate coliformi totali le colonie di colore rosa cresciute entro le 24 h.
Tuttavia, è possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobatteriacee, a cui il gruppo dei coliformi totali appartiene, alla *prova della citocromossidasi*, quale prova di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

3.5. Conferma biochimica

3.5.1. Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su *agar soia triptone* ed incubare a 36±1°C per 24±2 h.
La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. I coliformi sono ossidasi-negativi.

3.5.2. Procedura

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1% preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio.
Una reazione negativa (tipica dei coliformi totali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore.
Una reazione positiva, indice della presenza di batteri diversi dai coliformi, è evidenziata da una colorazione blu-violetto.

3.6. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi totali isolati si calcola in base al numero di colonie contate sul substrato di isolamento ed eventualmente sottoposte a conferma, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL), considerando le eventuali diluizioni effettuate.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992),*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed., (Washington, APHA).
CNR–IRSA (1994), *Metodi Analitici per le Acque.* Quaderno 100 (Roma).
BONADONNA, L. (1994), *Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche.* Tecnica Sanitaria, 1994, 32: 151-159.
KILIAN M., BULOW P. (1976), *Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases.* Acta Pathol Microbiol Scand [B]. 84B(5):245-51.

COLIFORMI FECALI

1. Introduzione

Si tratta di un gruppo che comprende diversi generi di batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee. Hanno forma di bastoncello, sono gram-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni e, in base alla definizione basata sulla tecnica della fermentazione, fermentano il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 44,5±0,2°C in 24 ore.
I coliformi fecali fanno parte di quella frazione di microrganismi appartenenti al gruppo delle Enterobatteriacee, evidenziabili con le tecniche di seguito indicate, che costituisce un indubbio indice di contaminazione fecale dell'acqua esaminata. Essi sono presenti nel materiale fecale ad una concentrazione media di 10^8 UFC/g. Nelle acque reflue grezze le loro concentrazioni possono raggiungere valori compresi tra $10^5 \div 10^7$/100 mL di campione. I metodi per il loro rilevamento utilizzano una temperatura più elevata come fattore discriminante per distinguerli dai membri del gruppo dei coliformi di origine non fecale.
I metodi proposti consentono di valutare il numero dei microrganismi presenti in un determinato volume di acqua reflua. Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta *(TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI)*. Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.

Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati due substrati alternativi.

2. Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

2.1. Volume da analizzare

Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

2.3. Reagenti e Terreni di coltura*

2.3.1. Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

Brodo Lattosato

Composizione:	Estratto di carne	3	g
	Peptone	5	g
	Lattosio	5	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,9± 0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

Brodo al Lauril Triptosio

Composizione:	Triptosio	20	g
	Lattosio	5	g
	Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
	Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
	Sodio cloruro	5	g
	Sodio lauril solfato	0,1	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,8±0,2		

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato. Si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.3.2. Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

EC Medium

Composizione:	Triptosio	20	g
	Lattosio	5	g
	Sali di bile n. 3	1,5	g
	Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
	Potassio diidrogeno fosfato	1,5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,9±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.4. Procedura

2.4.1. Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva, agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 min. Incubare a 36±1°C. Dopo 24±2 h agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 h. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48±3 h costituisce una reazione positiva presuntiva. Sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

2.4.2. Prova di conferma
Prelevare, sterilmente, un'ansata o 1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 h) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il brodo per la prova di conferma. Incubare i tubi a 44,5±0,2°C per 24±2 h. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi fecali.
Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute *(TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI)*, calcolare il valore dell'indice MPN.

2.5. Espressione dei risultati
Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione, considerando le eventuali diluizioni effettuate.

3. Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF)
Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi fecali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche. Di seguito vengono proposti due substrati di isolamento alternativi, idonei al rilevamento dei coliformi fecali nelle acque reflue.

3.1. Volume da analizzare
Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3.2. Strumentazione e vetreria
Normale attrezzatura di laboratorio.

3.3. Reagenti e Terreni di coltura*
3.3.1. Terreni di isolamento
mFC Agar

Composizione:	Triptosio	10	g
	Proteose peptone n. 3 o polipeptone	5	g
	Estratto di lievito	3	g
	Sodio cloruro	5	g
	Lattosio	12,5	g
	Sali di bile	1,5	g
	Blu di anilina	0,1	g
	Agar	15	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare in acqua distillata contenente 10 mL di acido rosolico all'1% in NaOH 0,2 N. Non sterilizzare. Conservare il terreno distribuito in capsule Petri a circa +4°C per non più di 2 settimane.

Substrato cromogeno agarizzato I

Composizione:	Triptosio	10	g
	Triptofano	1	g

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-ß-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	g
Acqua distillata	1.000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a +4°C per non più di 2 settimane.

3.3.2. Substrato di crescita
Agar soia triptone

Composizione:			
	Triptone	15	g
	Peptone di soia	5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Agar	20	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,2± 0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane.

3.3.3.Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato
Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:			
	N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
	Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

3.4. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 44,5±0,2°C per 18÷24 h.
Sul terreno *mFC Agar* i coliformi fecali crescono come colonie blu, ma possono presentare diverse sfumature del colore. Alcuni *Escherichia coli* possono formare colonie atipiche di colore giallo chiaro. Colonie di colore grigio-crema sono generalmente formate dai coliformi non fecali.
Sul s*ubstrato cromogeno agarizzato I* gli stessi microrganismi sviluppano colonie di colore verde-blu. La presenza di *Escherichia coli* è evidenziata dalla crescita di colonie di colore verde-blu che risultano fluorescenti alla luce ultravioletta.
Tuttavia, è possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobatteriacee, a cui il gruppo dei coliformi fecali appartiene, alla prova della citocromossidasi, quale prova di con-

ferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

3.5. Conferma biochimica

3.5.1. Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su *agar soia triptone* ed incubare a 36±1°C per 24±2 h.
La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. I coliformi sono ossidasi - negativi.

3.5.2. Procedura

Prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo s*oluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%* preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio.
Una reazione negativa (tipica dei coliformi fecali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore.
Una reazione positiva, indice della presenza di batteri diversi dai coliformi, è evidenziata da una colorazione blu-violetto.

3.6. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi fecali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte a conferma, sul substrato di isolamento, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL) considerando le eventuali diluizioni utilizzate.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed., (Washington, APHA).

CNR-IRSA (1994), *Metodi analitici per le acque*. Quaderno 100 (Roma).

KILIAN M., BULOW P. (1976), *Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases.* Acta Pathol Microbiol Scand [B]. 84B(5):245-51.

GELDREICH E.E., CLARK H.F., HUFF C.B., BEST L.C. (1965), *Fecal coliform organism medium for the membrane filter technique.* J. Am. Water Works Ass. 57:208.

STREPTOCOCCHI FECALI

1. Introduzione

Il gruppo degli Streptococchi fecali comprende diverse specie appartenenti al genere *Streptococcus*. Sono batteri gram positivi, a cellule coccoidi, compresi nel gruppo sierologico D di Lancefield, con tendenza a disporsi a catena in terreni liquidi, aerobi e anaerobi facoltativi, catalasi negativi. Si ritrovano nel tratto gastrointestinale degli animali a sangue caldo e pertanto sono considerati, con i coliformi, indicatori tradizionali di contaminazione fecale nelle acque.

Era stata precedentemente valutata la possibilità che la proporzione tra numero di streptococchi fecali e di coliformi fecali potesse dare una indicazione sulla origine fecale dell'inquinamento. Con un rapporto ≥ 4 la contaminazione si considerava presumibilmente di derivazione umana, mentre era considerata diversa (animale) se il rapporto fosse stato $\leq 0,7$. Tuttavia il valore di questa proporzione è stato messo in discussione a causa della diversa capacità di sopravvivenza da parte dei microrganismi considerati. Inoltre, la maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte degli streptococchi fecali, alterando la proporzione numerica tra i due gruppi di indicatori (coliformi e streptococchi), può essere causa di erronee interpretazioni. Pertanto il calcolo del rapporto tra i due indicatori di inquinamento fecale non dovrebbe avere validità per caratterizzare l'origine della contaminazione.

Nelle acque reflue le concentrazioni degli streptococchi fecali per 100 mL di acqua sono comprese tra $10^4 \div 10^6$.

I metodi proposti consentono di valutare il numero dei microrganismi presenti in un determinato volume di acqua reflua. Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità degli streptococchi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta *(TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI)*.

Matodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato.

2. Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità degli streptococchi fecali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di streptococchi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

2.1. Volume da analizzare

Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

2.3. Reagenti e Terreni di coltura*

2.3.1. Brodo per lo svolgimento della prova presuntiva

Brodo all'Azide Destrosio

Composizione:	Estratto di carne	4,5	g
	Triptone	15	g
	Glucosio	7,5	g
	Sodio cloruro	7,5	g
	Sodio azide	0,2	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.3.2. Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio

Composizione:	Peptone	20	g
	Destrosio	5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Dipotassio idrogeno fosfato	2,7	g
	Potassio diidrogeno fosfato	2,7	g
	Sodio azide	0,4	g
	Violetto di etile	0,83	mg
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.4. Procedura

2.4.1. Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva, agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30'. Incubare a 36±1°C per 48±3 h. Dopo incubazione, agitare ciascun tubo per verificare la presenza di torbidità (risultato positivo). Registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano intorbidimento del brodo e sottoporre i tubi positivi alla prova di conferma.

2.4.2. Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, un'ansata o 1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (torbidità entro le 48 h) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio per la prova di conferma. Incubare i tubi a 36± 1°C per 24+24 h. Considerare positivi i tubi che presentano intorbidimento accompagnato da un deposito grigio-violetto sul fondo del tubo.

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute *(TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI)*, calcolare il valore dell'indice MPN.

2.5. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione considerando le eventuali diluizioni effettuate.

3. Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione degli streptococchi fecali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche.

3.1. Volume da analizzare

Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

3.3. Reagenti e Terreni di coltura

3.3.1. Terreno di isolamento

m-Enterococcus Agar

Composizione:			
	Triptosio	20	g
	Estratto di lievito	5	g
	Destrosio	2	g
	Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
	Sodio azide	0,4	g
	2,3,4 trifenil-tetrazolio cloruro	0,1	g
	Agar	10	g
	Acqua distillata	1000	mL
	pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non sterilizzare. Dopo avere sciolto la polvere distribuire in capsule di Petri e conservare a circa +4°C per non più di 1 settimana.

3.3.2. Substrato di crescita

Agar Soia Triptone

Composizione:			
	Triptone	15	g
	Peptone di soia	5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Agar	20	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,2± 0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121°C per 15'. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane.

3.3.3. Substrato di conferma
Terreno all'Esculina e bile

Composizione:			
	Estratto di carne	3	g
	Peptone	5	g
	Bile	40	g
	Esculina	1,0	g
	Citrato ferrico	0,5	g
	Agar	15	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,1±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121°C per 15'. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 1 settimana.

3.3.4. Reattivo per la prova della catalasi
Acqua ossigenata al 3%.
La soluzione è disponibile in commercio pronta all'uso alla concentrazione indicata. Conservare al riparo dalla luce diretta e ad una temperatura di circa +4°C.

3.4. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 36± 1°C per 48± 2 h. Sono considerate di streptococchi fecali le colonie di colore dal rosso scuro al rosso chiaro.
È opportuno procedere, per la verifica dell'appartenenza al gruppo degli Streptococchi fecali, alle prove dell'idrolisi dell'esculina e della catalasi, quali prove di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

3.5. Conferma biochimica

3.5.1. Prova dell'idrolisi dell'esculina
Trasferire, dopo incubazione, dal terreno *m-Enterococcus Agar* sul terreno *all'esculina e bile*, le membrane su cui si sono sviluppate le colonie di presunti streptococchi fecali. Dopo incubazione a 36±1°C per 2 h si considerano di streptococchi fecali quelle colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana e sul terreno stesso, compare un alone nero-marrone.

3.5.2. Prova della catalasi
Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su *Agar soia triptone* ed incubare a 36±1°C per 24÷48 h.
La prova differenzia i microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Streptococcaceae* da quelli appartenenti alla famiglia delle *Micrococcaceae*.

3.5.3. Procedura
Strisciare su un vetrino portaoggetti una colonia cresciuta sul substrato di crescita e ricoprirla con alcune gocce di *acqua ossigenata al 3%.*
Evidenziare la reazione: l'assenza della formazione di bolle costituisce una prova positiva per la caratterizzazione degli streptococchi fecali che mancano di catalasi. La presenza dell'enzima è invece rilevata dallo sviluppo di bollicine di gas.

3.6. Espressione dei risultati

Il numero di streptococchi fecali si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL) considerando le eventuali diluizioni effettuate.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. XVIII ed. (Washington, APHA).

CNR–IRSA (1994), *Metodi analitici per le acque*. Quaderno 100. (Roma).

Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana (1985), *Ricerca degli streptococchi fecali in acque di balneazione con la tecnica delle membrane filtranti: prova finale alternativa.* Decreto 12 agosto 1985, del 3 settembre 1985, n. 207.

ESCHERICHIA COLI

1. Introduzione

Mentre le denominazioni "coliformi totali" e "coliformi fecali" fanno riferimento a gruppi batterici eterogenei, il termine *Escherichia coli* corrisponde ad una specie tassonomicamente definita, a sua volta compresa nella famiglia delle Enterobattericee. *Escherichia coli* è un microrganismo a forma di bastoncello gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno che fermenta il lattosio con produzione di gas alla temperatura di 44,5°C (analogamente al gruppo dei coliformi fecali del quale fa parte), produce indolo in terreni contenenti triptofano, presenta la reazione al Rosso-metile positiva, negativa la reazione di Voges-Proskauer.
Per talune peculiari caratteristiche *Escherichia coli* sembra meglio soddisfare i requisiti insiti nella definizione di organismo indicatore, rispetto ai tradizionali indicatori di contaminazione fecale dell'acqua. Già da tempo l'Organizzazione Mondiale della Sanità considera questa specie come indicatore primario di inquinamento di origine fecale. Tale scelta è motivata dalla maggiore stabilità della sua presenza nell'ambiente acquatico nel corso dell'anno rispetto ai coliformi che risulterebbero più sensibili alle variazioni stagionali e non di meno dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei patogeni enterici. Inoltre nell'ambito del gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ampiamente rappresentato ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, a differenza dei microrganismi di origine non necessariamente fecale, appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Klebsiella e Citrobacter* che si caratterizzano per uno spiccato potenziale di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente.
Finora il rilevamento e la precisa identificazione di *Escherichia coli* ha sempre richiesto una serie di prove aggiuntive, in quanto la sua ricerca, effettuata con i metodi analitici tradizionali, ne consentiva una diagnosi presuntiva. Più di recente sono stati formulati substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni che si basano sullo sfruttamento di attività enzimatiche specifiche. I dati riportati in letteratura sembrano confermare, da parte di questi substrati, non solo la possibilità di evidenziare direttamente la specie ricercata e una maggiore selettività e specificità rispetto a quelli tradizionali, ma anche una maggiore efficienza di rilevamento.
Di seguito sono proposti due metodi per il rilevamento di *Escherichia coli*, uno tradizionale, il metodo dei tubi multipli, e l'altro che prevede l'applicazione del metodo della filtrazione su membrana con terreno agarizzato addizionato con sostanze cromogene.
I metodi proposti consentono di valutare il numero dei microrganismi presenti in un determinato volume di acqua reflua.

Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità di *Escherichia coli* in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta *(TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI)*.

Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.

2. Metodo A: Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità di *Escherichia coli* in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

2.1. Volume da analizzare
Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

2.2. Strumentazione e vetreria
Normale attrezzatura di laboratorio.

2.3. Reagenti e Terreni di coltura*
2.3.1. Brodo per lo svolgimento della prova presuntiva
Brodo Lattosato

Composizione:	Estratto di carne	3	g
	Peptone	5	g
	Lattosio	5	g
	Acqua distillata	1000	mL
	pH 6,9± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.3.2. Brodo per lo svolgimento della prova di conferma
Brodo Triptofano

Composizione:	Triptone	10	g
	Acqua distillata	1000	mL
	pH 6,9± 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente.

2.3.3. Reattivo alla p-dimetilaminobenzaldeide

Composizione:	p-dimethil-aminobenzaldeide	5	g
	Alcool isoamilico	75	mL
	Acido cloridrico al 90%	25	mL

Il reagente, una volta preparato, deve essere di colore giallo.

2.4. Procedura
2.4.1. Prova presuntiva
Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva, agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 min. Incubare a 36±1°C. Dopo 24±2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48±3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva, sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

2.4.2. Prova di conferma
Prelevare sterilmente 1 mL di brodocoltura dai tubi di Brodo Lattosato risultati positivi (formazione di gas entro le 48 h) e procedere all'inoculo nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo Triptofano. Incubare a 44±0,2°C per 24±2 h.
Dopo incubazione aggiungere 0,2-0,3 mL del reagente alla p-dimetilaminobenzaldeide. Dopo 10 min osservare la reazione: lo sviluppo di un colore rosso scuro sulla superficie della brodocoltura nello strato superficiale alcoolico costituisce una reazione positiva per la produzione di indolo; una colorazione gialla indica reazione negativa.
In relazione alla produzione di indolo a partire dal triptofano, *Escherichia coli* dà reazione positiva e in generale gli organismi del gruppo dei coliformi si pongono come segue:

Escherichia coli	+	(una limitata percentuale -)
Citrobacter freundii	-	
Klebsiella/Enterobacter	+ o -	

Nell'eventualità sia necessario procedere all'identificazione biochimica dei microrganismi isolati utilizzare i kit miniaturizzati disponibili in commercio da utilizzare in base alle istruzioni della ditta produttrice.

2.5. Espressione dei risultati
Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute *(TABELLA 1 – GENERALITÀ SUI METODI MICROBIOLOGICI)*.

3. Metodo B: Metodo della filtrazione su membrana (MF)
Con questo metodo viene calcolata la concentrazione di *Escherichia coli* che, presente in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, ha formato colonie tipiche.

3.1. Volume da analizzare
Per l'analisi delle acque reflue grezze è necessario analizzare diluizioni del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3.2. Strumentazione e vetreria
Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessaria una lampada a U.V.

3.3. Reagenti e Terreni di coltura*
3.3.1 Terreno di isolamento
Substrato cromogeno agarizzato I

Composizione:			
	Triptosio	10	g
	Triptofano	1	g
	Peptocomplesso	5	g
	Estratto di lievito	3	g
	Sodio cloruro	5	g
	Sali di bile n. 3	1,5	g
	IPTG	0,1	g
	5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
	4-metilumbelliferil-ß-D-glucuronide	0,05	g

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

Agar Bios LL	13 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,8±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115°C per 15 min. Distribuire in capsule petri e lasciare solidificare. Conservare a +4°C per non più di 2 settimane.

3.4. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 44,5±0,2°C per 18-24 ore.
Sul substrato cromogeno agarizzato I *Escherichia coli* sviluppa colonie di colore verde-blu che risultano fluorescenti alla luce ultravioletta.
Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

3.5. Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente confermate, sul substrato di isolamento, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL) .

Bibliografia

APHA., AWW. (1992), *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater* , XVIII ed. (Washington D.C., APHA).
CNR–IRSA (1994), *Metodi analitici per le acque*. Quaderno 100, Roma.

SALMONELLA SPP

1. Introduzione

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee, gram negativi, generalmente mobili con flagelli peritrichi, anaerobi facoltativi. Le salmonelle sono classificate in base ai caratteri sierologici che differenziano circa 2.000 tra tipi e sierotipi. Sono prevalentemente caratterizzate dalla presenza di due tipi di antigeni: antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcooli, e antigeni ciliari (H), termolabili.
Salmonella typhi ed altre salmonelle possiedono anche un antigene denominato Vi, strettamente correlato all'antigene somatico, ma diverso da questo in quanto termolabile. Sono microrganismi patogeni e possono essere strettamente adattati ad un particolare ospite o essere ubiquitari e ritrovarsi in ospiti diversi. L'infezione è a trasmissione fecale-orale o associata alla contaminazione di alimenti e di acqua. Nell'uomo può manifestarsi con febbri enteriche, gastroenteriti, setticemia e tifo.
Salmonella è ampiamente diffusa nell'ambiente dove può anche sopravvivere. La sua presenza nell'ambiente idrico rappresenta inequivocabilmente l'esistenza di una contaminazione fecale primaria (immissione diretta di scarichi fognari) o secondaria (dilavamento di suoli contaminati). Nelle acque reflue la presenza di *Salmonella* è variabile nelle densità in funzione delle patologie diffuse all'interno della popolazione.
Il metodo proposto consente di valutare la Presenza/Assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua reflua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere Arricchimento, Isolamento ed eventualmente, Conferma biochimica e Conferma sierologica.

2. Volume da analizzare

Il volume minimo da analizzare è pari a 10 mL per l'analisi delle acque reflue grezze, ma per acque sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reagenti e terreni di coltura*

4.1 Substrato di arricchimento

Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis

Composizione:			
	Peptone di soia	5	g
	Sodio cloruro	8	g
	Potassio diidrogeno fosfato	1,6	g
	Magnesio cloruro × 6 H_2O	40	g
	Verde malachite	40	mg
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 5,2±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in tubi e sterilizzare. Conservare a circa +4°C per non più di una settimana.

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

Brodo alla Selenite e Cistina

Composizione:	Digerito pancreatico di caseina	5	g
	Sodio fosfato	10	g
	Lattosio	4	g
	Selenite acida di sodio	4	g
	L-cistina	0,01	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in tubi, eventualmente doppio concentrato, e sterilizzare. Conservare a circa +4°C per non più di una settimana.
Il terreno colturale è adatto alla ricerca anche di *Salmonella typhi*, tuttavia il suo uso richiede precauzioni particolari e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

4.2. Substrati di isolamento

Hektoen Enteric Agar

Composizione:	Peptone	12	g
	Estratto di lievito	3	g
	Sali biliari	9	g
	Lattosio	12	g
	Saccarosio	12	g
	Salicina	2	g
	Sodio cloruro	5	g
	Sodio iposolfito	5	g
	Citrato ferrico ammoniacale	1,5	g
	Agar	13,5	g
	Blu di bromotimolo	64	mg
	Fucsina acida	40	mg
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,6±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.
Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento di *Salmonella* che garantiscono buoni risultati in fase analitica anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutti i sierotipi di *Salmonella* presenti. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

Xilosio Lisina Desossicolato

Composizione:	Xilosio	3,5	g
	L-Lisina	5	g
	Lattosio	7,5	g
	Saccarosio	7,5	g
	Cloruro di sodio	5	g
	Estratto di lievito	3	g

Rosso fenolo	0,08	g
Desossicolato di sodio	2,5	g
Tiosolfato di sodio	6,8	g
Citrato di ferro ammoniacale	0,8	g
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1.000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

Rambach Agar

Composizione:			
	Glicole propilenico	10,5	g
	Estratto di lievito	2	g
	Peptone	5	g
	Sodio desossicolato	1	g
	Sodio cloruro	5	g
	Rosso neutro	0,03	g
	Cromogeno	1,5	g
	Agar	15	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova in commercio e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

È un terreno colturale particolarmente selettivo per *Salmonella,* le cui colonie sono ben individuabili.

4.3. Substrato di crescita

Triptone Soia Agar

Composizione:			
	Triptone	15	g
	Peptone di soia	5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Agar	20	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare a 121°C per 15'. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

4.4. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:			
	N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
	Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

4.5. Substrato per la prova della fermentazione dei carboidrati

Agar al ferro di Kliger

Composizione:	Estratto di carne	3	g
	Estratto di lievito	3	g
	Peptone	20	g
	Sodio cloruro	5	g
	Lattosio	10	g
	Glucosio	1	g
	Ferro citrato	0,3	g
	Sodio tiosolfato	0,3	g
	Agar	12	g
	Rosso fenolo	50	mg
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provette e, dopo sterilizzazione a 121°C per 15', lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

4.6. Substrato per la prova della decarbossilazione della lisina

Agar al ferro e lisina

Composizione:	Casitone	5	g
	Estratto di lievito	3	g
	Destrosio	1	g
	L-lisina	10	g
	Ferro ammonio citrato	0,5	g
	Agar	13,5	g
	Sodio tiosolfato	40	mg
	Porpora bromocresolo	20	mg
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 6,2±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provette e, dopo sterilizzazione a 121°C per 12', lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane.

5. Procedura

5.1. Fase di arricchimento

Per le acque reflue grezze eseguire l'inoculo del campione in 10 mL doppio concentrato del Brodo di arricchimento *di Rappaport Vassiliadis* e in aggiunta o in alternativa del *Brodo alla Selenite e Cistina.* Quest'ultimo è raccomandato qualora debba essere ricercata in particolare *S. typhi.*

Incubare il *Brodo di Rappaport Vassiliadis* a 42±0,5°C per 24+24 h.
Incubare il *Brodo alla Selenite e Cistina* a 37±1°C per 24+24 h.

5.2. Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

Dal brodo di arricchimento *di Rappaport Vassiliadis* o del *Brodo alla Selenite e Cistina* eseguire, prelevando un'ansata, 2 subcolture per strisci multipli sui terreni di isolamento: la prima dopo 24 h di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore. Incubare le piastre a 36±1°C per 24 h.
Su *Hektoen Enteric Agar* le colonie sospette di *Salmonella* si presentano verdi con margini netti con o senza centro nero.
Su *Xilosio Lisina Desossicolato* le colonie sospette di *Salmonella* si presentano rosse con centro nero, lucide, convesse e con margini netti.
Su *Rambach Agar* il 97-99% delle colonie di *Salmonella* si presentano rosse. *S. paratyphi* e *S. typhi* crescono invece come colonie incolori. Alcuni stipiti di *Pseudomonas* possono crescere come colonie rosse; tuttavia la loro presenza può essere messa in evidenza con la prova della citocromossidasi.

6. Conferma biochimica

Qualora si ritenga opportuno, è possibile procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Salmonella* delle colonie sospette eseguendo la prova della citocromossidasi, della fermentazione dei carboidrati e della decarbossilazione della lisina .
Successivamente l'identificazione biochimica può essere completata con i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio, per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Salmonella*.
Prima di effettuare ciascuna prova si suggerisce, onde verificarne la purezza, di subcoltivare le colonie sospette su *Triptone Soia Agar* e incubare a 36±1°C per 24 h. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

6.1. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* da quelli appartenenti al genere *Pseudomonas* che possono produrre colonie simili sul terreno di isolamento. Le salmonelle sono ossidasi-negative.
Dal terreno *Triptone Soia Agar* prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo soluzione di *Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%* preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro 10 secondi una colorazione blu-violetto.

6.2. Prova della fermentazione dei carboidrati

Dal terreno *Triptone Soia Agar* prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno *Agar al ferro di Kliger*. Incubare a 36±1°C per 18÷24 h. È essenziale che i risultati vengano registrati dopo 18-24 h di incubazione. Sebbene *Citrobacter* possa dare le stesse reazioni di *Salmonella,* per la interpretazione dei risultati si devono annotare le reazioni riportate nella Tabella 1.
Le reazioni dopo 18-24 h di incubazione a 36±1°C per alcune delle specie di *Salmonella* sono riportare nella Tabella 2.

6.3. Prova della decarbossilazione della lisina

Dal terreno *Triptone Soia Agar* prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno *Agar al ferro e lisina.* Incubare a 36±1°C per 18÷24 h.
I microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina (violetta) sia del becco, sia del cilindro; una colorazione gialla (acida) indica una reazione negativa. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno.

Tabella 1 - Utilizzazione dei carboidrati su Agar al ferro di Kliger

Reazione sulla superficie inclinata	Acidità	colore giallo
	Alcalinità	colore rosso
Reazione di profondità	Acidità	colore giallo
	Alcalinità	colore rosso
Produzione di gas	Presente	bolle o rottura dell'agar
	Assente	
Produzione di H_2S	Presente	annerimento del terreno
	Assente	

Tabella 2 - Reazioni dopo 18-24 h di incubazione a 36±1°C

Microrganismo	*Superficie*	*Profondità*	*Gas*	*H_2S*
Salmonella spp.	Rosso	Giallo	+	+
Salmonella typhi	Rosso	Giallo	–	+
Salmonella paratyphi	Rosso	Giallo	–	–

7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*.
Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella*:: Assente o Presente nel volume esaminato e, se del caso, il sierotipo individuato.

Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF (1992), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* XVIII ed., (Washington, APHA).

CNR–IRSA (1983), *Metodi Analitici per i Fanghi.* Quaderno 64. (Roma).

BONADONNA, L., LATINI M., DI GIROLAMO I., OTTAVIANI M. (1994), *Valutazione della contaminazione microbiologica di fanghi di depurazione di reflui civili: problemi legati alle metodiche di analisi.* Rapporti ISTISAN 94/17, Roma

VIBRIO SPP.

1. Introduzione

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sono ampiamente distribuiti nell'ambiente acquatico e possono essere isolati, oltre che da acque reflue e acque estuariali, anche da acque dolci superficiali non contaminate da scarichi fecali. *Vibrio cholerae* è la specie più importante del gruppo che fa parte della famiglia delle *Vibrionaceae*. Al genere appartengono microrganismi motili, bastoncelli gram-negativi, asporigeni e anaerobi facoltativi. Diverse sono le specie, alcune delle quali alofile. Di *V. cholerae* sono stati individuati più di 130 sierogruppi e prima del 1992 solo il sierogruppo O1 era stato associato a epidemie e casi di colera. Dal 1993 tuttavia il sierogruppo O139 (non-O1) è ritenuto responsabile delle epidemie registrate nei Paesi dell'area orientale.
Vibrio è abbastanza sensibile ai trattamenti delle acque, ma in modo particolare alla clorazione delle acque, che è tuttora considerata una efficace misura di prevenzione per la diffusione del microrganismo.
Il metodo proposto consente di valutare la Presenza/Assenza di *Vibrio* in un determinato volume di acqua reflua. La procedura analitica consiste in due fasi successive che comprendono Arricchimento, Isolamento ed eventualmente, Conferma biochimica e Conferma sierologica.

2. Volume da analizzare

Il volume minimo da analizzare è pari a 100 mL per l'analisi delle acque reflue grezze, ma per acque sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria.

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reagenti e terreni di coltura*

4.1. Substrato di arricchimento

Acqua Peptonata Alcalina

Composizione:	Peptone	10	g
	Sodio cloruro	10	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 8,5±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Raffreddare e modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di *NaOH 0,1 N*. Distribuire in beute in ragione di 200 mL/beuta e sterilizzare. Conservare a circa +4°C per non più di quattro settimane.

Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N

Composizione:	Idrossido di sodio	4	g
	Acqua distillata	1.000	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione.

* Per la sterilizzazione dei terreni di coltura i tempi e le temperature sono indicate dalle rispettive ditte fornitrici.

4.2. Substrato di isolamento

Agar al Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio (TCBS)

Composizione:	Estratto di lievito	5	g
	Peptone	10	g
	Sodio tiosolfato	10	g
	Sodio citrato	10	g
	Sali di bile	8	g
	Saccarosio	20	g
	Sodio cloruro	10	g
	Citrato ferrico	1	g
	Agar	14	g
	Blu di bromotimolo	40	mg
	Blu timolo	40	mg
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 8,6±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti, raffreddare. Se necessario, modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di *NaOH 0,1 N*. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di quattro settimane.
È stato osservato che la selettività dei diversi terreni TCBS presenti sul mercato può essere diversa: ciò può portare a risultati diversi nella crescita del microrganismo ricercato. Con prove di controllo di qualità verificare le rese quali-quantitative dei substrati.

4.3. Substrati di crescita

Triptone Soia Agar con NaCl all'1%

Composizione :	Triptone	15	g
	Peptone di soia	5	g
	Sodio cloruro	5	g
	Agar	20	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Brodo al Triptone di Soia con NaCl all'1%

Composizione:	Digerito pancreatico di caseina	17	g
	Digerito papainico di farina di soia	3	g
	Sodio cloruro	5	g
	Dipotassio idrogeno fosfato	2,5	g
	Destrosio	2,5	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare e agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Distribuire in tubi aliquote di circa 10 mL. Sterilizzare. Conservare a circa +4°C per non più di un mese.

4.4. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:			
	N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
	Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. Tuttavia è da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

4.5. Vibriostatico

In commercio esistono dischetti da 10 µg e da 150 µg di vibriostatico 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina fosfato).

5. Procedura

5.1. Fase di Arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo.
Per le acque reflue grezze inoculare un'aliquota del campione in 200 mL di *Acqua Peptonata Alcalina*. Incubare a 36±1°C per 6÷8 h, fino a un massimo di 18 h. Per i campioni ambientali sono anche stati ottenuti buoni risultati con incubazione a 42°C.

5.2. Fase di Isolamento ed identificazione delle colonie

Dal brodo di arricchimento *Acqua Peptonata Alcalina* prelevare un'ansata dalla pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio sul terreno di isolamento *Agar al Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio (TCBS)*. Incubare a 36±1°C per 18÷20 h. È consigliabile contemporaneamente prelevare 10 mL di brodocoltura dal brodo di arricchimento e inoculare in un'altra beuta contenente 100 mL di Acqua Peptonata Alcalina. Incubare a 36±1°C per 6÷8 h, fino a un massimo di 18 h. Dopo incubazione prelevare un'ansata dalla pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio su un'altra piastra Petri contenente TCBS. Incubare a 36±1°C per 18÷20 h.
I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sviluppano sul substrato di isolamento colonie gialle con centro opaco e margini traslucidi, piatte, con diametro di 2÷4 mm e colonie verdi, piatte, con diametro di 1÷3 mm.

6. Conferma biochimica

Qualora si ritenga opportuno, è possibile procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Vibrio* delle colonie sospette eseguendo la colorazione di Gram, la prova della citocromossidasi e la prova della suscettibilità al vibriostatico.
Successivamente l'identificazione biochimica può essere completata con i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.
Prima di effettuare ciascuna prova si suggerisce, onde verificarne la purezza, di subcoltivare le colonie sospette su *Triptone Soia Agar con NaCl all'1%* e incubare a 36±1°C per 24 h. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 h di sviluppo.

6.1. Colorazione di Gram

Eseguire sulle colonie da verificare la colorazione di Gram. I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* si presentano come bastoncelli Gram negativi, in alcuni casi ricurvi.

6.2. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. *Vibrio* spp è ossidasi-positivo ad eccezione di *V. metchnichovi* che è ossidasi negativo.

Dal terreno *Triptone Soia Agar con NaCl all'1%* prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo *Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%* preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione positiva si evidenzia quando si produce, entro 10 secondi, una colorazione blu-violetto.

6.3. Prova della suscettibilità al vibriostatico

La prova può permettere di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* da quelli appartenenti al genere *Aeromonas*. *Vibrio* spp è in genere suscettibile al vibriostatico.

Dal terreno *Triptone Soia Agar con NaCl all'1%* prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia da saggiare e inoculare *in Brodo al Triptone di Soia con NaCl all'1%*. Incubare a 36±1°C per 18÷24 h. La crescita è evidenziata dalla torbidità del terreno. Imbibire un tampone sterile nella brodocoltura e strisciare abbondantemente sul terreno *Triptone Soia Agar con NaCl all'1%.* Sulla superficie dell'agar applicare, ad adeguata distanza, un dischetto da 10 µg e uno da 150 µg di vibriostatico O/129. Incubare a 36±1°C per 18÷24 h.

Dopo incubazione verificare l'eventuale presenza o assenza di aloni di inibizione intorno ai dischetti. *Vibrio* spp. è generalmente sensibile al vibriostatico (presenza di alone), mentre *Aeromonas* è resistente. Recentemente sono stati riportati casi in cui biotipi di *V. cholerae* sono risultati resistenti al vibriostatico (es.: *V. cholerae* O139).

7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Vibrio* possono essere tipizzati utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la tipizzazione di *Vibrio*.

Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come *Vibrio*: Assente o Presente nel volume analizzato e, se del caso, il sierogruppo individuato.

Bibliografia:

KAY, B.A., BOPP C.A., WELLS J.G., (1994), *Isolation and identification of Vibrio cholerae O1 from fecal specimens*" In: "Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives. I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik" Ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.

KAYSNER, C. A., HILL W. E., (1994), *Toxigen Vibrio cholerae O in food and water*. In: "Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives. I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik" Ed. American Society for Microbiology, Washington D.C..

UOVA DI ELMINTI

1. Introduzione

Nel passato, sotto il termine Elminti veniva raggruppato un insieme eterogeneo di animali o stadi di animali vermiformi che non sembravano possedere caratteri distintivi tali da farli comprendere in altri gruppi zoologici. Attualmente l'Organizzazione Mondiale della Sanità prende in considerazione gli Elminti che interessano la parassitologia umana distinguendo due gruppi di organismi distinti, appartenenti ai phyla Platyhelmintha e Nematoda. Del gruppo degli Elminti fa parte anche il phylum Acantocephala, in cui sono compresi organismi parassiti degli animali. Il phylum Platyhelmintha è suddiviso nelle classi dei Turbellari - la gran parte a vita libera - dei Trematodi e dei Cestodi - parassiti dell'uomo e degli animali. Le forme infettive richiedono almeno un ospite intermedio e le cisti (*Fasciola*) e le uova (*Echinococcus granulosus*) hanno quale modo di trasmissione prevalente la via fecale-orale e alimentare; gli stadi larvali (es. cercarie di *Schistosoma haematobium*) penetrano attivamente attraverso la cute in occasione di immersioni in acque contaminate dal rilascio, da parte dell'ospite intermedio - in questo caso un serpente acquatico - della forma infettiva. Il phylum Nematoda è considerato uno dei gruppi di organismi più diffuso in natura. Ne sono state descritte 12.000 specie, molte delle quali vivono nell'acqua dolce o marina, in acque termali o ad alta salinità. Altre hanno il loro habitat nel suolo o nella materia organica in decomposizione e alcune possono fare parte del benthos e del plancton marino. Nematodi predatori della famiglia delle Aporcelaimidae, Diplogasteridae, Dorylaimidae e Mononchidae abbondano nelle acque superficiali, nutrendosi di altri nematodi, oligocheti e altri piccoli invertebrati. Circa 5.000 specie parassitano le piante e gli animali; una dozzina ha grande importanza in patologia umana. La letteratura distingue, in generale, il phylum Nematoda in due gruppi: forme parassite - a vita non acquatica - e forme a vita libera - acquatiche. Nematodi parassiti comprendono specie quali *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus,* che generano patologie nell'uomo penetrando, allo stadio di larva, attraverso la pelle e le mucose. *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* e *Trichuris trichiura,* patogeni per ingestione, si trasmettono per via fecale-orale, sebbene in alcuni casi le uova possano essere ritrovate nelle acque. In questi casi l'acqua non risulta essere un veicolo di trasmissione dell'infezione tranne che per *Dracunculus medinensis.* I Nematodi parassiti che, come tali, hanno un riscontro con la patologia umana, hanno una prevalente distribuzione tropicale e subtropicale e la loro diffusione interessa vaste aree del continente africano, asiatico e alcune zone dell'Europa nord - orientale. Attualmente in Italia i Nematodi che si riscontrano nelle acque sono diffusi dagli animali e non hanno rilevanza in patologia umana.
Per il riuso di acque reflue le linee-guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità prevedono la ricerca di questo parametro e raccomandano, per l'irrigazione di vegetali da mangiare crudi e di cereali, alberi e pascoli, una concentrazione di Nematodi intestinali pari a ≤ 1 uova L^{-1} (media aritmetica).
Di seguito viene descritto il metodo per la determinazione della presenza di uova di Elminti in acque reflue. Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo. La procedura non ne consente la determinazione a livello di specie.

2. Principio del metodo

Prevede una fase di sedimentazione e una serie di centrifugazioni seguite da una flottazione e dalla evidenziazione delle uova al microscopio. È da ricordare che esiste la possibilità di utilizzare, durante la fase di flottazione, reagenti diversi. Qui viene riportata la composizione di due reagenti da utilizzare in alternativa. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un reagente o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore.

3. Volume da analizzare

Il volume da analizzare è pari a 1÷10 L per l'analisi delle acque reflue grezze, ma per le acque sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

4. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, è necessario disporre di:
- centrifuga a rotore basculante per contenitori a fondo conico da 20 mL;
- contenitori da centrifuga da 20 mL con fondo conico;
- microscopio.

5. Reagenti

Soluzione di sodio nitrato

Composizione:	$NaNO_3$	50	g
	Acqua distillata	100	mL

Preparare una soluzione satura di sodio nitrato sciogliendo il sodio nitrato in acqua distillata.

Soluzione di zinco solfato

Composizione:	$ZnSO_4$	55	g
	Acqua distillata	100	mL

La soluzione può essere utilizzata per la fase di flottazione in alternativa a quella di sodio nitrato. Sciogliere lo zinco solfato in acqua distillata.

6. Procedura

6.1. 1ª Sedimentazione

Distribuire il campione, in base al volume da analizzare, in uno o più beaker o, preferibilmente in coni Imhoff. Lasciare sedimentare per una notte e procedere allo svolgimento dell'analisi il giorno successivo.

6.2. Centrifugazione

Dopo la fase di sedimentazione rimuovere il supernatante e trasferire un massimo di 3 mL di pellet in tubi da centrifuga da 20 mL. Lavare le pareti del contenitore dove è avvenuta la sedimentazione con acqua distillata per raccogliere ogni eventuale residuo e aggiungerla al pellet nei tubi. Centrifugare per 10' a 700 rpm e successivamente scartare il supernatante.

6.3. Flottazione

Aggiungere 3 mL della *soluzione di sodio nitrato* al pellet residuo e centrifugare per 3 min a 1.000 rpm. Ripetere l'intera procedura per un totale di tre volte e, ogni volta, rimuovere accuratamente il supernatante che, nell'ultima fase, contiene, se presenti, le uova di Elminti. Con questa procedura è possibile ottenere una percentuale di recupero pari a circa il 70%, quando la concentrazione delle uova è di 100 per litro.
In alternativa, aggiungere 3 mL della *soluzione di zinco solfato* al pellet residuo e centrifugare per 3 min a 1.000 rpm. Ripetere l'intera procedura come descritto sopra.

6.4. 2ª Sedimentazione

Porre i supernatanti ottenuti dopo flottazione, in beaker, o preferibilmente, in coni Imhoff, contenenti 1 L di acqua. Lasciare sedimentare per circa 12 h. Successivamente eliminare accuratamente il superna-

tante e trasferire il pellet in tubi da centrifuga. Lavare le pareti del contenitore dove è avvenuta la sedimentazione con acqua distillata per raccogliere ogni eventuale residuo e aggiungerla al pellet nei tubi. Centrifugare per 4' a 1000 rpm.

7. Osservazione al microscopio

Raccogliere il pellet su un vetrino ed esaminare al microscopio a 100x verificando la presenza di uova di Elminti.

8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato come Presenza/Assenza di uova di Elminti nel volume esaminato.

Bibliografia

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (1989), *Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture.*

SATCHWELL M.G. (1986), *An adaptation of concentration techniques for the enumeration of parasitic Helminth eggs from sewage sludge.* Wat. Res. 7: 813-816.

TEICHNANN A. (1986), *Zur methodik des quantitativen nachweis von helminthenstation in konnunalen abwassern.* Angewandte Parasitologie 27: 145-150.

OOCISTI DI CRYPTOSPORIDIUM E CISTI DI GIARDIA

1. Introduzione

Cryptosporidium parvum è un protozoo coccide riconosciuto come patogeno per l'uomo dal 1976. Il suo ciclo biologico è monoxeno e comprende fasi di riproduzione sessuata ed asessuata che portano alla formazione di oocisti. *Giardia lamblia* è un protozoo flagellato, riconosciuto come patogeno per l'uomo dalla metà degli anni '60; è anch'esso caratterizzato da un ciclo biologico monoxeno e la forma infettante è rappresentata dalla cisti. Nell'uomo i due parassiti causano forme acute di gastroenteriti, il cui esito è funzione dello stato di immunocompetenza dell'ospite. In particolare, l'infezione da *Cryptosporidium* nei soggetti immunodepressi e negli individui HIV-positivi può assumere un andamento cronico e portare alla morte. Entrambi i protozoi si trasmettono per via fecale-orale, attraverso l'ingestione delle oocisti e delle cisti; l'acqua è stata riconosciuta come il principale veicolo di infezione. Nelle acque reflue il valore di concentrazione di cisti di *Giardia* può variare da 0 a 10^4 L^{-1} mentre per *Cryptosporidium* è compreso tra 0 e 10^3 L^{-1}. La scarsa specificità d'ospite ne favorisce la diffusione nell'ambiente: infatti, l'uomo e molti animali, sia selvatici che di allevamento o domestici, sono serbatoi di infezione. Inoltre, le ridotte dimensioni delle cisti ed oocisti, tali da assicurarne il passaggio attraverso i filtri a sabbia durante i trattamenti di depurazione, unite alla elevata resistenza alle intemperanze ambientali, alla bassa dose infettante e alla elevata capacità di resistenza sia ai fattori ambientali sia ai processi di trattamento delle acque (compresa la disinfezione), fanno sì che la presenza di *Cryptosporidium* e *Giardia* nelle acque acquisti notevole rilevanza sanitaria.
Di seguito vengono descritti due metodi che possono essere utilizzati per la determinazione della concentrazione delle cisti ed oocisti di protozoi in acque reflue. Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero dei metodi. Le seguenti procedure inoltre non consentono la determinazione dei protozoi a livello di specie né permettono di valutarne l'infettività e la vitalità.

2. Metodo 1

2.1. Principio del metodo

Prevede la filtrazione su filtro a capsula di volumi noti d'acqua, l'eluizione delle cisti ed oocisti con una soluzione di lavaggio mediante uno shaker, la concentrazione e la purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione, la determinazione e il conteggio al microscopio delle cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

2.2. Volume da analizzare

Il volume minimo da analizzare è pari a 5÷10 L per l'analisi delle acque reflue grezze, ma per le acque sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

2.3. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, è necessario disporre di:

- agitatore con braccetti;
- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- centrifuga refrigerata (+4°C) a rotore basculante per contenitori da 50÷250 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga da 250 mL con fondo conico o tipo bottiglia;
- contenitori da centrifuga disposable da 50 e 15 mL con fondo conico;
- filtro a capsula in polietersulfone, (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 12 cm di lunghezza, 1.300 cm^2 di superficie);
- membrane di policarbonato, 1,2 µm di porosità, 25 mm di diametro;

- microscopio a epifluorescenza con filtri di eccitazione 450÷490 nm, filtro barriera 515÷520 nm, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase o, meglio, del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- regolatore di flusso;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel kit per l'immunofluorescenza).

2.4. Reagenti

Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:	Na_2HPO_4	0,76	g
	NaH_2PO_4	0,02	g
	Formaldeide	100	mL
	Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata adottando dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica.

Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:	NaCl	80	g
	KH_2PO_4	2	g
	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	29	g
	KCl	2	g
	Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,4±0,2 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Sterilizzare in autoclave per 15' a 121°C.
La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

Soluzione di PBS 1x

Composizione:	Soluzione PBS 10x	100	mL
	Acqua distillata	900	mL

Mescolare i due componenti.

Soluzione di Percoll-Saccarosio

Composizione:	Percoll (densità=1,13)	45	mL
	Saccarosio 2,5 M	10	mL
	Acqua distillata	45	mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09÷1,1 con un idrometro.
Tutta la procedura deve essere svolta mantenendo i reattivi a circa +4°C.

Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione:	Saccarosio	855,8	g
	Acqua distillata	400	mL

Far sciogliere il saccarosio nell'acqua distillata preriscaldata. Raffreddare e portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

Tampone per eluizione

Composizione:	Laureth 12	1	g
	Tris 1M, pH 7,4	10	mL
	EDTA, $2Na \bullet 2H_2O$ 0,5 M, pH 8,0	2	mL
	Antischiuma A	150	µL
	Acqua distillata		

Pesare il Laureth-12 in un beaker di vetro pirex e aggiungere 100 mL di acqua distillata. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth-12 di sciogliersi. Trasferire la soluzione in un matraccio da 1 L.
Sciacquare il beaker numerose volte e mettere l'acqua di risciacquo nel matraccio. Aggiungere gli altri reattivi. Portare ad 1 L con acqua distillata.

Tris 1 M, pH 7,4

Composizione:	Tris	121,1	g
	Acqua distillata		

Sciogliere il Tris nell'acqua e portare a pH 7,4±0,2 con HCl o NaOH 1 N. Portare a 1 L con acqua distillata.
Sterilizzare con un filtro a membrana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

Acido etilendiaminotetracetico (EDTA) bisodico, biidrato, 0,5 M, pH 8,0

Composizione:	EDTA 2 Na•2 H_2O	186,1	g
	Acqua distillata		

Sciogliere l'EDTA nell'acqua e portare a pH 8,0±0,2 con HCl o NaOH 1 N. Portare a 1 L con acqua distillata.

Soluzione di lavaggio A

Composizione:	PBS 10x	100	mL
	Tween-80	1	mL
	Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
	Antischiuma B	500	µL
	Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

Soluzione di lavaggio B

Composizione:	PBS 10 x	100	mL
	Tween 20	0,5	mL
	Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

Componenti: Anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC).
Controllo positivo;
Controllo negativo;
Tampone di lavaggio;
Soluzione di montaggio (Mounting Medium).

2.5. Procedura

2.5.1. Campionamento

Il campionamento può essere effettuato ponendo la pompa e gli altri accessori a valle della capsula oppure a monte della stessa. Il flusso deve essere intorno a 2 L min^{-1}. Avviare la pompa ed aprire la valvola di sfiato della capsula girandola in senso orario, in modo che l'aria possa uscire dalla capsula stessa. Procedere con il campionamento.

Ad operazione conclusa rimuovere l'entrata del tubo dalla fonte d'acqua e consentire alla pompa di pompare il resto dell'acqua rimasta nel tubo dentro la capsula. Staccare quindi il tubo di uscita e tappare l'estremità di uscita della capsula, quindi staccare l'altra estremità facendo attenzione a non perdere l'acqua rimasta, e tapparla. In ogni caso, il campionamento deve considerarsi concluso quando il flusso viene ridotto in conseguenza dell'intasamento della capsula. Trasportare la capsula in condizioni refrigerate in laboratorio.

2.5.2. Eluizione della capsula

L'eluizione di una capsula richiede 240 mL di *tampone per eluizione.*

Qualora l'acqua rimasta nella capsula riempisse meno della metà della cartuccia, mantenerla nella cartuccia e procedere con l'eluizione. Se invece l'acqua rimasta nella capsula riempisse più della metà della cartuccia, svuotarla in un contenitore e tenerla da parte come parte del campione.

Con un cilindro graduato aggiungere 120 mL di *tampone per eluizione* attraverso l'estremità di entrata della capsula. Collocare la capsula nell'agitatore in maniera tale che la valvola di sfiato posta sulla sua estremità di ingresso sia posizionata a ore 12; procedere all'agitazione per 5' a 600 rpm. Versare l'eluato in un tubo da centrifuga.

Aggiungere gli altri 120 mL di *tampone per eluizione* attraverso l'estremità di entrata della capsula e procedere all'agitazione per 5' a 600 rpm, posizionando il lato di ingresso della capsula in modo tale che la valvola di sfiato sia ad ore 9.

Unire tutto l'eluato all'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte. Centrifugare a 1.100 xg per 10' e decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare con delicatezza il supernatante. Misurare il volume del campione concentrato (1÷10 mL).

Il trattamento può essere sospeso in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di *soluzione tamponata di formaldeide al 10%* .

Qualora il procedimento di concentrazione avesse portato ad un campione finale di eccessiva torbidità per un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza, si procede alla chiarificazione del campione.

2.6. Chiarificazione per flottazione

Preparare 30 mL di *soluzione Percoll-Saccarosio* per ogni campione e procedere nel seguente modo.

Porre 0,5 mL di campione concentrato (dal volume totale di 1÷10 mL) in una provetta conica da 50 mL , aggiungere 19,5 mL di *soluzione di lavaggio A* e miscelare. Iniettare con l'ausilio di una siringa provvista di cannula, 30 mL di *soluzione di Percoll-Saccarosio* sotto i 20 mL di sospensione facendo attenzione a non rompere l'interfaccia tra le due componenti.

Centrifugare a 1.050 xg per 10' a circa +4°C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione.

Prelevare con cura il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di *Percoll-Saccarosio* (per un totale di circa 25 mL) e raccoglierlo in una provetta da 50 mL.

Introdurre nella provetta contenente il campione chiarificato la *soluzione di lavaggio B* fino a raggiungere il volume di 50 mL, mescolare con vortex e centrifugare a 1.050 xg per 15'.

Aspirare il supernatante e raccogliere il pellet (1-5 mL).

2.7. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Si usano anticorpi monoclonali anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC, che si legano ad antigeni presenti sulle pareti.

2.7.1. Procedimento su vetrino a pozzetto
Prima dell'uso i *reattivi del kit* devono essere portati a temperatura ambiente. Trasferire 10-30 µL di campione in un pozzetto, 10 µL di controllo positivo in un altro pozzetto e 10 µL di controllo negativo in un altro ancora e distribuirli, con l'ausilio di una bacchetta di plastica, su tutta la superficie disponibile.
Asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a circa 37°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del kit. Mettere 20÷50 µL di anticorpi fluoresceinati su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Lavare il vetrino con molta cautela usando il tampone di lavaggio fornito dal kit *o soluzione di PBS 1x*. Asciugare i vetrini all'aria. Montare il vetrino coprioggetto con una goccia di soluzione di montaggio, facendo attenzione a non formare bolle.

2.7.2. Procedimento su filtro
Prima dell'uso i *reattivi del kit* devono essere portati a temperatura ambiente. Porre la membrana (porosità 1,2 µm, in policarbonato, di diametro 25 mm) sul supporto di filtrazione e bagnarla con *soluzione di PBS 1x* ; filtrare 1 mL di campione. Evitare che il campione posto sulla membrana vada a secco durante tutti i passaggi. Aggiungere una goccia di anticorpi fluoresceinati. Incubare per 30 min a temperatura ambiente al buio. Filtrare, quindi lavare per tre volte la membrana con *soluzione di PBS 1x* aggiungendone 3 mL e filtrando di volta in volta. Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione.
Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, quindi montare il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

2.8. Esame microscopico
Osservare tutto il vetrino a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio ad epifluorescenza ed individuare le strutture fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8÷12 µm e larghezza 7÷10 µm) e oocisti di *Cryptosporidium* (3,5÷6,5 µm), utilizzando un micrometro lineare ed effettuando dei confronti con il controllo positivo. Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti. Questa valutazione consente di fornire una determinazione presuntiva delle cisti ed oocisti.
Effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, quindi passare sull'obiettivo con il contrasto di fase o con il contrasto ad interferenza differenziale (DIC). Con il contrasto di fase è possibile distinguere le cisti ed oocisti piene da quelle vuote e, quindi, dare un'ulteriore indicazione sulla presunta vitalità delle cisti ed oocisti piene. Con il microscopio a contrasto interferenziale è invece possibile valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoiti e granuli residui nel *Cryptosporidium*), valutazione che consente sia di confermare la determinazione, sia di dare una ulteriore indicazione in merito alla condizione delle cisti ed oocisti: si possono distinguere, infatti, cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate.
Registrare il numero totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium.*
Se è stata effettuata anche la valutazione con il contrasto di fase annotare il numero di cisti ed oocisti che risultano piene o vuote.
Se è stata effettuata anche la valutazione con il DIC, annotare il numero di cisti ed oocisti vuote, con contenuto amorfo o con strutture interne.
Per effettuare le valutazioni al contrasto di fase o con il DIC è consigliabile utilizzare la tecnica di immunofluorescenza su vetrino a pozzetto perché questa condizione consente una maggiore trasparenza.

2.9. Interpretazione dei risultati

Ogni campione che presenta una o più strutture tipiche assimilabili a cisti di *Giardia* o oocisti di *Cryptosporidium* per fluorescenza, forma e dimensioni può essere considerato presuntivamente un campione positivo.

La torbidità, il particolato organico ed inorganico del campione d'acqua possono interferire con il recupero delle cisti ed oocisti nella fase di concentrazione e purificazione e con la determinazione delle strutture al microscopio.

Organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti possono interferire durante la determinazione al microscopio a epifluorescenza e causare la registrazione di falsi positivi.

Le sostanze utilizzate nella disinfezione possono determinare delle interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché possono causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe e pertanto irriconoscibili.

2.10. Espressione dei risultati

Il numero di cisti ed oocisti contate si riferisce al volume analizzato sul vetrino stesso; tale numero viene quindi rapportato al volume di pellet chiarificato e moltiplicato per il volume dell'eluato (1÷10 mL). Il risultato viene infine rapportato al numero di litri di campione filtrati.

3. Metodo 2

3.1. Principio del metodo

Prevede la filtrazione di campioni di acqua su membrana di porosità nominale 1,2 µm, la dissoluzione della membrana in un solvente, la concentrazione dell'emulsione mediante centrifugazione, il lavaggio del pellet con solventi, la determinazione e la conta al microscopio delle cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

3.2. Volume da analizzare

Il volume minimo da analizzare è pari a 5÷10 L per l'analisi delle acque reflue grezze, ma per le acque sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

Questo metodo consente di analizzare volumi variabili d'acqua in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più membrane per filtrare il volume appropriato.

3.3. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, è necessario disporre di:

- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (+4°C) a rotore basculante per contenitori da 50÷500 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga in polipropilene (PP) o in etilene propilene fluorato (teflon-FEP), da 50 mL con fondo conico;
- filtro a membrana in acetato di cellulosa con porosità nominale 1,2 µm, diametro 142 mm;
- membrane in policarbonato, di porosità 1,2 µm e di diametro 25 mm;
- microscopio a epifluorescenza con filtri di eccitazione 450÷490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase o, meglio, del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- regolatore di flusso;
- supporto per filtro a membrana da 142 mm;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette.

3.4. Reagenti

Acetone

Etanolo

Etanolo al 70%

Composizione:	Etanolo	700	mL
	Acqua distillata	300	mL

Mescolare i due componenti.

Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:	Na_2HPO_4	0,76	g
	NaH_2PO_4	0,02	g
	Formaldeide	100	mL
	Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata adottando dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica.

Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:	NaCl	80	g
	KH_2PO_4	2	g
	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	29	g
	KCl	2	g
	Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Sterilizzare in autoclave per 15’ a 121°C.
La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

Soluzione di PBS 1x

Composizione:	Soluzione PBS 10x	100	mL
	Acqua distillata	900	mL

Mescolare i due componenti.

Soluzione di lavaggio A

Composizione:	PBS 10x	100	mL
	Tween-80	1	mL
	Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
	Antischiuma B	500	µL
	Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

Componenti: Anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC).
Controllo positivo;
Controllo negativo;
Soluzione di montaggio (Mounting Medium).

3.5. Procedura

3.5.1. Campionamento

Il supporto per filtro a membrana è connesso mediante tubo semirigido alla pompa aspirante; un prefiltro (porosità 100÷300 μm) è interposto tra pompa e supporto. Nella filtrazione si consiglia di non superare la pressione di circa 2 bar.

Con l'ausilio di pinzette rimuovere la membrana dal supporto e porla in un tubo da centrifuga da 50 mL. Durante il trasporto mantenere i tubi alla temperatura di circa +4°C. Conservare alla stessa temperatura se non si procede subito alla dissoluzione. Si consiglia di trattare il campione entro 24÷48 ore dal prelievo.

3.5.2. Dissoluzione della membrana

Riempire il tubo con *acetone* fino a portarlo a 50 mL. Agitare mediante vortex per 2÷3', fino alla completa dissoluzione della membrana.

Centrifugare a 7.000 rpm per 15' e lasciare che il rotore si fermi senza usare il freno. Eliminare il supernatante arrivando fino a 2 cm dal fondo, con l'accortezza di non disturbare il pellet. Portare a 50 mL con acetone, risospendere il pellet agitando mediante vortex o eventualmente con l'aiuto di una pipetta. Centrifugare a 7.000 rpm per 15'. Eliminare il supernatante come sopra indicato.

3.5.3. Lavaggi del pellet

Portare il pellet a 50 mL con *etanolo* e risospenderlo mediante vortex. Centrifugare a 7.000 xg per 15', aspirare il supernatante e sospendere nuovamente il pellet portandolo a 50 mL con *etanolo al 70%* ed agitando. Centrifugare a 7.000 xg per 15', scartare il supernatante e risospendere il pellet con la *soluzione di lavaggio A*, sempre portandolo a 50 mL. Agitare mediante vortex. Centrifugare a 7.000 xg per 15', scartare il supernatante e risospendere il pellet in *soluzione PBS 1x* (volume finale del campione circa 1÷5 mL). Misurare il volume. Il trattamento può essere sospeso in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di *soluzione tamponata di formaldeide al 10%* .

Qualora il procedimento di concentrazione avesse portato ad un campione finale di eccessiva torbidità per un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza, si procede alla chiarificazione del campione. Per la preparazione dei reagenti per la chiarificazione del campione si rimanda al Metodo 1.

3.6. Chiarificazione per flottazione

Preparare 30 mL di *soluzione di Percoll-Saccarosio* per ogni campione e procedere nel seguente modo.

Porre 0,5 mL di campione concentrato (dal volume totale di 1÷10 mL) in una provetta conica da 50 mL, aggiungere 19,5 mL di *soluzione di lavaggio A* e miscelare. Iniettare con l'ausilio di una siringa provvista di cannula, 30 mL di *soluzione di Percoll-Saccarosio* sotto i 20 mL di sospensione facendo attenzione a non rompere l'interfaccia tra le due componenti.

Centrifugare a 1.050 xg per 10' a circa +4°C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione.

Prelevare con cura il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di *Percoll-Saccarosio* (per un totale di circa 25 mL) e raccoglierlo in una provetta da 50 mL.

Introdurre nella provetta contenente il campione chiarificato la *soluzione di lavaggio B* fino a raggiungere il volume di 50 mL, mescolare con vortex e centrifugare a 1.050 xg per 15'.

Aspirare il supernatante e raccogliere il pellet (1÷5 mL).

3.7. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Si usano anticorpi monoclonali anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC, che si legano ad antigeni presenti sulle pareti.

3.7.1. Procedimento su vetrino a pozzetto
Prima dell'uso i *reattivi del kit* devono essere portati a temperatura ambiente. Trasferire 10-30 µL di campione in un pozzetto, 10 µL di controllo positivo in un altro pozzetto e 10 µL di controllo negativo in un altro ancora e distribuirli, con l'ausilio di una bacchetta di plastica, su tutta la superficie disponibile.
Asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a circa 37°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del kit. Mettere 20÷50 µL di anticorpi fluoresceinati su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Lavare il vetrino con molta cautela usando il tampone di lavaggio fornito dal kit o la *soluzione di PBS 1x*. Asciugare i vetrini all'aria. Montare il vetrino coprioggetto con una goccia di soluzione di montaggio, facendo attenzione a non formare bolle.

3.7.2. Procedimento su filtro
Prima dell'uso i *reattivi del kit* devono essere portati a temperatura ambiente. Porre la membrana (porosità 1,2 µm, in policarbonato, di diametro 25 mm), sul supporto di filtrazione e bagnarla con *soluzione di PBS 1x* ; filtrare 1 mL di campione. Evitare che il campione posto sulla membrana vada a secco durante tutti i passaggi. Aggiungere una goccia di anticorpi fluoresceinati. Incubare per 30 min a temperatura ambiente al buio. Filtrare, quindi lavare per tre volte la membrana con *PBS 1x* aggiungendone 3 mL e filtrando di volta in volta. Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione.
Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, quindi montare il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

3.8. Esame microscopico
Osservare tutto il vetrino a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio ad epifluorescenza ed individuare le strutture fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8÷12 µm e larghezza 7÷10 µm) e oocisti di *Cryptosporidium* (3,5÷6,5 µm), utilizzando un micrometro lineare ed effettuando dei confronti con il controllo positivo. Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti. Questa valutazione consente di fornire una determinazione presuntiva delle cisti ed oocisti.
Effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, quindi passare sull'obiettivo con il contrasto di fase o con il contrasto ad interferenza differenziale (DIC). Con il contrasto di fase è possibile distinguere le cisti ed oocisti piene da quelle vuote e, quindi, dare un'ulteriore indicazione sulla presunta vitalità delle cisti ed oocisti piene. Con il microscopio a contrasto interferenziale è invece possibile valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoiti e granuli residui nel *Cryptosporidium*), valutazione che consente sia di confermare la determinazione, sia di dare una ulteriore indicazione in merito alla condizione delle cisti ed oocisti: si possono distinguere, infatti, cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate.
Registrare il numero totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium.*
Se è stata effettuata anche la valutazione con il contrasto di fase, annotare il numero di cisti ed oocisti che risultano piene o vuote.
Se è stata effettuata anche la valutazione con il DIC, annotare il numero di cisti ed oocisti vuote, con contenuto amorfo o con strutture interne.
Per effettuare le valutazioni al contrasto di fase o con il DIC è consigliabile utilizzare la tecnica di immunofluorescenza su vetrino a pozzetto perché questa condizione consente una maggiore trasparenza.

3.9. Interpretazione dei risultati
Ogni campione che presenta una o più strutture tipiche assimilabili a cisti di *Giardia* o oocisti di *Cryptosporidium* per fluorescenza, forma e dimensioni può essere considerato presuntivamente un campione positivo.

La torbidità, il particolato organico ed inorganico del campione d'acqua possono interferire con il recupero delle cisti ed oocisti nella fase di concentrazione e purificazione e con la determinazione delle strutture al microscopio.
Organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti possono interferire durante la determinazione al microscopio a epifluorescenza e causare la registrazione di falsi positivi.
Le sostanze utilizzate nella disinfezione possono determinare delle interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché possono causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe e pertanto irriconoscibili.

3.10. Espressione dei risultati
Il numero di cisti ed oocisti contate si riferisce al volume analizzato sul vetrino stesso; tale numero viene quindi rapportato al volume di pellet chiarificato e moltiplicato per il volume dell'eluato (1÷10 mL). Il risultato viene infine rapportato al numero di litri di campione filtrati.

Bibliografia

EPA, (1995), *Protozoan method for detecting Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in water by a fluorescent antibody procedure* US-EPA, EPA/814-B-95-003. Standard Methods 1996.
EPA (1997), *Cryptosporidium in water by filtration/IMS/FA and viability by DAPI/PI.* US-EPA, EPA 821-D-97-001, Method 1622(Draft).
ALDOM J.E., CHAGLA A.H. (1995), *Recovery of Cryptosporidium oocysts from water by a membrane filter dissolution method.* Appl. Environ. Microbiol. 20: 186-187.
GRACZYK T.K., CRANFIELD M.R., FAYER R.(1997), *Recovery of waterborne oocysts of Cryptosporidium from water samples by the membrane-filter dissolution method.* Parasitol. Res. 83: 121-125.
GRACZYK T.K., FAYER R., CRANFIELD M.R.,OWENS R. (1997), *Cryptosporidium parvum oocysts recovered from water by the membrane dissolution method retain their infectivity.* J. Parasitol. 83 (1): 111.114.

VIRUS

1. Introduzione

In questi ultimi anni si è assistito ad un progressivo sfruttamento delle risorse idriche, mentre al tempo stesso è aumentata la produzione sia di acque reflue parzialmente o completamente trattate sia di fanghi di risulta che derivano dal trattamento delle stesse acque reflue.
La vigente legislazione permette, là ove possibile, il riuso a scopo agricolo sia delle acque reflue trattate che dei fanghi. Il vantaggio é ovviamente duplice: il riutilizzo, in maniera più o meno controllata, di tali acque o fanghi e la possibilità di poter reintegrare con materiale organico terreni sempre più impoveriti a causa dell'uso dei concimi chimici. Il rischio infettivo é legato sia al contatto diretto con acque e fanghi da parte del personale addetto alla loro manipolazione che alla possibile contaminazione di falde acquifere sotterranee.
Durante il trattamento a cui sono sottoposti i liquami, si nota un progressivo trasferimento dei virus dalle acque ai fanghi di risulta degli impianti di depurazione delle acque reflue, in particolar modo nei fanghi primari. Tale bioaccumulo è compreso tra il 25 ed il 90% di tutti i virus enterici eventualmente presenti.
Le acque reflue, dopo trattamento, vengono sversate in fiumi, laghi e/o mare. La contaminazione delle acque di mare è ormai ampiamente dimostrata e tra i parametri per le acque di balneazione è compresa la ricerca di virus enterici con un valore di 0 Unità Formanti Placche (UFP) per 10 L di acqua. La contaminazione delle acque costiere comporta indirettamente la contaminazione dei frutti di mare. In Italia, questi ultimi sono responsabili del 60÷70% delle epatiti acute di tipo A.
I virus umani e/o animali sono parassiti strettamente endocellulari, quindi necessitano di cellule umane e/o animali in cui moltiplicarsi. Parallelamente alle tecniche di isolamento dei virus in colture cellulari sono stati sviluppati altri metodi per la messa in evidenza dei virus quali i test immunologici e di biologia molecolare.
I test immunologici più comunemente utilizzati sono: immunomicroscopia elettronica, test immunoenzimatici, immunofluorescenza e test radioimmunologici. Molti di questi test sono ormai reperibili commercialmente, ma in alcuni casi richiedono una certa praticità da parte dell'operatore. I test di immunomicroscopia elettronica molto difficilmente possono essere applicati al campione ambientale tal quale in quanto la sensibilità del test è estremamente bassa.
Tutti i test sierologici si basano sull'utilizzo di un anticorpo marcato (radioattivo, test radioimmunologici; enzimatico, test Elisa; fluoresceina, test di immunofluorescenza) e specifico verso un determinato antigene del virus.
Negli anni più recenti accanto ai test tradizionali sono stati messi a punto metodi di analisi biologico-molecolari. Tali sistemi comprendono le sonde molecolari o probes sia a DNA che RNA (test di ibridazione), e più recentemente, la reazione a catena della polimerasi o PCR. L'estrema sensibilità delle tecniche biologico-molecolari e la possibilità di identificare virus di cui ancora non è nota una linea cellulare suscettibile all'infezione, ha determinato una notevole diffusione di tali tecniche.
Le sonde molecolari sono costituite da DNA o RNA complementare ad una sequenza specifica ed unica del genoma virale. Tali sonde, come nel caso degli anticorpi, sono marcate con enzimi o fosforo radioattivo. L'uso delle sonde molecolari per la ricerca dei virus enterici ha avuto il merito di avere introdotto tecniche di biologia molecolare nel campo ambientale, ma presenta un unico limite legato alla loro sensibilità, che le rende applicabili solo ad acque notevolmente inquinate.
Il test PCR consiste in un'amplificazione selettiva di una porzione unica e specifica del genoma seconda una reazione del tipo 2^n, con n uguale al numero dei cicli di amplificazione. Alla fine del test la sequenza è stata copiata, da apppositi enzimi, fino ad un massimo di 10^6 copie. L'amplificato può essere successivamente risolto ed identificato sia su gel di agarosio, in quanto essendo nota la sequenza se ne conosce anche dimensione e peso molecolare, sia mediante test di ibridazione su supporto solido utilizzando apposite sonde marcate.

Sebbene tale test sia largamente accettato, esistono anche in questo campo diversi problemi legati soprattutto alla presenza di inibitori aspecifici e non delle reazioni enzimatiche. Diverse procedure sono state adottate al fine di eliminare inibitori dal campione ambientale; è bene comunque considerare che ogni metodica deve essere sempre attentamente valutata in laboratorio ed adattata alle personali esigenze.

2. Metodologie per il recupero dei virus dalle acque reflue

L'uomo elimina con le feci tutta una "varietà" di virus enterici, più di 100 differenti sierotipi classificabili in 8÷9 famiglie differenti. Ognuno dei diversi sierotipi tende a comportarsi in maniera differente nelle diverse matrici ambientali.
Alcuni Autori, almeno per i liquami ove la presenza di virus enterici è pensabile, hanno ipotizzato una semina diretta del campione previa decontaminazione ed eliminazione della carica batterica. Tale tecnica è stata presto abbandonata a causa dell'elevata tossicità dei liquami sui sistemi cellulari. In genere è sempre preferibile procedere ad una concentrazione del campione, da attuarsi in una o due fasi, prima della semina su cellule. La ricerca dei virus in sedimenti e fanghi di risulta a sua volta necessita, prima della concentrazione, di un'ulteriore fase di estrazione del virus dal materiale organico a cui i virus stessi sono legati.
Numerose metodiche sono state proposte nel corso degli anni, alcune vanno ricordate solo come riferimento storico (il metodo della garza), altre possono essere utilizzate con volumi d'acqua piuttosto limitati (separazione in due fasi, elettrosmosi).
La maggior parte delle metodiche di concentrazione ed estrazione sfruttano la proprietà di "macromolecola proteica" del virus. La struttura proteica dei virus conferisce a quest'ultimo le proprietà di un colloide idrofilo a carattere anfoterico, ove la carica elettrica varia in funzione del pH e della forza ionica dell'ambiente idrico. In sostanza, i virus possono essere adsorbiti e poi staccati dai differenti supporti caricati positivamente o negativamente (membrane piane o cartucce) in funzione del pH del mezzo.
In altri casi, i virus possono essere concentrati sfruttando il loro peso molecolare come avviene per l'ultrafiltrazione.
Nel complesso, tra tutte le metodiche esistenti per la ricerca dei virus enterici a partire da campioni di acque, sono consigliabili la concentrazione-eluizione su membrane a carica elettropositiva o elettronegativa e il metodo dell'ultrafiltrazione.
La prima tecnica si basa sulla capacità dei virus di adsorbirsi su supporti solidi (membrane o cartucce) e successivamente di essere eluiti facendo variare il pH. I fattori che influenzano notevolmente la capacità di recupero dei virus enterici sono: la composizione e struttura del supporto solido (membrane o cartucce), la forza ionica del mezzo, il pH, la presenza di materiale organico, ecc. Esistono oramai in commercio una varietà di membrane piane di diverso diametro e di cartucce di superficie totale altrettanto variabile. Non tutte le membrane sono in grado di concentrare i virus enterici né uno stesso tipo di membrana o cartuccia può essere utilizzato per tutti i virus.
Dopo la fase di adsorbimento su supporto solido, i virus sono eluiti utilizzando una gamma di eluenti proteici a pH generalmente alcalino.

3. Volumi da analizzare

I volumi da analizzare nel caso della ricerca di virus enterici sono variabili e comunque superiori a quelli delle analisi batteriologiche. A titolo di esempio va ricordato come la legislazione italiana preveda, per il parametro enterovirus, 10 L per campione di acqua di mare ed 1 g per sedimenti marini.
Nel caso di acque reflue è consigliabile analizzare almeno 1 L di acqua non trattata sino ai 10 L ed oltre delle acque in uscita da un impianto di trattamento per acque reflue. Per quanto attiene i fanghi di risulta il campione da analizzare dovrebbe essere di 10÷20 g. Tale quantità é notevolmente superiore a quelle dei sedimenti marini, che presentano comunque un impatto ed un rischio sanitario notevolmente inferiore.

Sebbene sia consigliabile trasportare in sistemi refrigerati il campione da analizzare, è evidente che i volumi sono troppo elevati per poter assicurare una corretta refrigerazione. È quindi, consigliabile tenere il campione al riparo della luce solare diretta e trasportarlo, specie durante il periodo estivo, immediatamente in laboratorio.
Il campione dovrebbe essere analizzato al momento del suo arrivo in laboratorio, anche se, in caso di necessità, i campioni possono essere tenuti a temperatura ambiente per non più di 2 h o per 48 h a circa +4°C. Nelle acque reflue, così come nei fanghi di risulta, l'assenza di ossigeno determina l'instaurarsi di processi fermentativi e la produzione di ammoniaca che, in determinate condizioni e concentrazioni, presenta un'evidente attività anti-virale.

4. Metodi di concentrazione

4.1. Materiali

Estratto di carne al 3% -10% pH 7,0 e pH 9,5

Estratto di carne	3 o 10	g
Acqua ultrapura	100	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica. Portare il pH al valore desiderato con HCl 1 N o NaOH 1 N. Sterilizzare in autoclave (121°C per 15').
La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

Glicina 0,05M - estratto di carne al 3% pH 9,5.

Estratto di carne	3	g
Glicina	0,38	g
Acqua distillata	100	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica e portare il pH a 9,5±0,2 con NaOH 1 N. Sterilizzare in autoclave (121°C per 15 min).
La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

Soluzione salina fosfata (PBS) con o senza calcio e magnesio

In commercio esistono polveri e/o pastiglie da sciogliere direttamente in acqua ultrapura. Sciogliere la polvere o le pastiglie nella quantità di acqua ultrapura indicata in confezione. Dopo agitazione con barretta magnetica, sterilizzare in autoclave (121°C per 15').
La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

Soluzione di polietilenglicole 6.000 al 50% (p/v).

In un cilindro aggiungere:

Soluzione salina fosfata senza calcio e magnesio	90	mL
NaCl	12	g
PEG 6.000	80	g

Portare a 160 mL di volume totale sempre con *PBS senza calcio e magnesio.*
Aggiungere un magnete alla *soluzione di polietilenglicole 6.000 al 50% (PEG).* Sterilizzare in autoclave (15' a 121°C). Una volta prelevata la soluzione dall'autoclave, mettere ad agitare per diverse ore (od anche per tutta la notte) finché la soluzione non diviene limpida. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

Sodio tiosolfato allo 0,5%

Sodio tiosolfato	0,5	g
Acqua distillata	100	mL

Dissolvere per semplice agitazione e sterilizzare in autoclave (15' a 121°C). Aggiungere la *soluzione di sodio tiosolfato* in rapporto 1:100 al campione contenente ipoclorito.

Cloruro di magnesio 2,5M

Cloruro di magnesio esaidrato	508,25	g
Acqua distillata	1.000	mL

Dissolvere per semplice agitazione con barretta magnetica e sterilizzare in autoclave (15' a 121°C). Aggiungere la *soluzione di cloruro di magnesio* in rapporto 1:50 al campione.

Cloruro di alluminio 0,05 M

Cloruro di alluminio	6,66	g
Acqua distillata	1.000	mL

Dissolvere per semplice agitazione con barretta magnetica e sterilizzare in autoclave (15' a 121 °C). Aggiungere la *soluzione di cloruro di alluminio* al campione in rapporto 1:100.

Cloruro di sodio 0.15 M.

Cloruro di sodio	8,77	g
Acqua distillata	1.000	mL

Dissolvere per semplice agitazione con barretta magnetica e sterilizzare in autoclave (15' a 121 °C).

4.2. Adsorbimento-eluizione su membrane elettronegative

4.2.1. Preparazione del campione

Il campione raccolto in recipienti sterili è addizionato, per reflui contenenti cloro, con sodio tiosolfato a concentrazione finale di 50 mg L^{-1}. Il pH del campione è portato a 3,5 con HCl 1N. L'aggiunta di HCl deve avvenire lentamente con agitazione continua, controllando in continuo il pH, che non deve scendere a valori troppo bassi. L'adsorbimento è inoltre facilitato aggiungendo, prima dell'acidificazione, sali minerali quali cloruro di magnesio 2,5 M o cloruro di alliminio 0,05 M in rapporto soluzione/campione 1:50 o 1:100.

4.2.2. Concentrazione

Il procedimento di concentrazione prevede di:

- filtrare il campione alla velocità di circa 30 mL cm^{-2} min^{-1}
- lavare le membrane con una soluzione di 0.15M di NaCl in ragione di 1,5 mL cm^{-2} di membrana
- staccare i virus eventualmente adsorbiti (eluizione) alla membrana con una soluzione (eluente) a pH alcalino:

  3% estratto di carne pH 9,5 oppure
  0,05 M glicina 3% estratto di carne pH 9,5.

La soluzione di eluente deve essere filtrata lentamente al fine di favorire il distacco delle particelle virali presenti e comunque il volume di eluente da utilizzare è di 0,5 mL cm^{-2}. Alla fine dell'eluizione aumentare la pressione per svuotare completamente il sistema e ridurre il più possibile la perdita di eluente e quindi di virus.

Tamponare il pH dell'eluato a 7,2 ±0,2 con HCl 1 N e riconcentrare l'eluato, se il volume é troppo elevato per poter essere utilizzato su sistemi cellulari. A tal fine si possono utilizzare lo stesso tipo di membrane ma con diametro inferiore o un altro metodo di concentrazione secondaria.

4.3. Adsorbimento-eluizione su membrane elettropositive

4.3.1. Preparazione del campione

Nel caso di membrane a carica superficiale elettropositiva l'intervallo del pH a cui tali membrane possono operare è notevolmente più ampio rispetto alle membrane elettronegative e comunque compreso tra: 5,0 e 8,0. Il campione raccolto in recipienti sterili è addizionato, per reflui contenenti ipoclorito, con sodio tiosolfato a concentrazione finale di 50 mg L^{-1}.

4.3.2. Concentrazione

La procedura di concentrazione, tempi e volumi è identica a quella delle membrane elettronegative (punto 4.2.2.), se non per il fatto che il campione non necessita di essere addizionato con sali e acidificato.

4.4. Ultrafiltrazione a flusso tangenziale

L'ultrafiltrazione è un processo di separazione delle particelle in funzione del solo peso molecolare. Esistono diverse membrane con tagli molecolari (cut-off) da 1.000 sino a 1.000.000 di daltons. La funzione, delle membrane è quella di rappresentare una barriera tra le sostanze che possono passare la membrana stessa ed altre, a peso molecolare più elevato rispetto al taglio molecolare, che sono ritenute. Nel caso specifico dei virus enterici, vengono concentrati non per adsorbimento sulla membrana ma per riduzione progressiva del volume del campione dovuto a perdita di acqua, sali e soluti in base al cut-off scelto. La composizione delle membrane è in cellulosa e polisulfone, mentre sono presenti in commercio diversi sistemi di ultrafiltrazione che utilizzano sia membrane piane che cartucce preassemblate.

4.4.1. Preparazione del campione

Il campione non necessita di pretrattamenti sebbene, per migliorare il rendimento della membrana, è preferibile pretrattare le membrane con *estratto di carne al 3% pH 7,0±0,2.* La funzione del pretrattamento è quella di prevenire l'adsorbimento aspecifico dei virus alla membrana stessa. In commercio sono presenti sia membrane che possono essere montate in serie, al fine di aumentare la superfice totale filtrante, che cartucce preassemblate di dimensioni e superfici variabili.

4.4.2. Concentrazione

Montare le membrane secondo le istruzioni della casa produttrice.

Lavare le membrane con 5÷10 L di acqua distillata al fine di allontanare il liquido conservante. Pretrattare il sistema con *estratto di carne al 3% pH 7,0±0,2* facendolo ricircolare per 5 minuti. Lasciare il sistema, tubi e membrane, pieno di estratto di carne. Far circolare il campione alle segueti condizioni operative: 10÷12 psi in entrata, fermare l'apparecchio quando il recipiente del campione è quasi vuoto. In questo caso il volume del campione è rappresentato dal solo volume di riempimento dei tubi e di imbibizione delle membrane. Svuotare il sistema completamente e raccogliere il campione. Lavare le membrane con una *soluzione di estratto di carne al 3% pH 9,5±0,2*, utilizzando un volume pari a 3/4 dell'ultraconcentrato. Riunire l'ultraconcentrato con la soluzione di lavaggio. Neutralizzare il pH del campione-concentrato finale.

Il campione può essere ulteriormente concentrato se necessario, utilizzando sistemi di ultrafiltrazione in grado di trattare volumi minori di acqua o con un altro metodo di concentrazione secondaria.

A fine campionamento: Lavare la membrana con 1÷2 L di acqua distillata, far circolare in continuo per almeno 15 min NaOH 0,1 N, svuotare completamente in sistema da ogni residuo di NaOH e lavare la membrana con 2÷3 L di acqua distillata.

A questo punto la membrana di ultrafiltrazione può essere riutilizzata per un nuovo campione, ripartendo dalla fase iniziale di concentrazione, o conservata per successive analisi.

4.4.3. Conservazione della membrana

Dopo aver lavato la membrana con soda ed acqua, come alla fine di un campione, far circolare in continuo 500 mL di una soluzione di formaldeide 0,1% preparata al momento. Spegnere la pompa e lasciare la membrana quanto più bagnata possibile con formaldeide. Riporre la membrana in una busta o in appositi contenitori con una piccola quantità di soluzione di formaldeide al fine di impedire l'essiccamento della membrana stessa.

5. Concentrazione secondaria dei virus enterici

Al fine di ridurre il volume da seminare su colture cellulari è indispensabile, soprattutto quando si parte da grandi volumi di campione, procedere ad una seconda fase di concentrazione. Tutte le metodiche descritte nella prima fase di concentrazione (membrane elettronegative o positive, ultrafiltrazione) possono essere utilizzate nella seconda fase adottando membrane con diametro più piccoli o apparati per ultrafiltrazione in grado di ridurre al minimo i volumi.

Altri metodi secondari di concentrazione dei virus enterici sono: la flocculazione organica (attuabile solo per soluzioni proteiche), l'ultracentrifugazione, o la precipitazione con diversi agenti chimici: solfato di alluminio, cloruro di alluminio o di ferro, idrossido di magnesio, polietilenglicole 6000. Qui di seguito sono descritte le due metodiche più comunemente utilizzate: la flocculazione organica e la precipitazione con polietilenglicole 6.000.

5.1. Flocculazione organica

Questa tecnica si basa sulla capacità delle preteine di flocculare a pH acidi e comunque inferiori al punto isoelettrico dei virus. I virus presenti nel campione sono imprigionati nel flocculato e raccolti successivamente per semplice centrifugazione.

Questa metodica è applicabile solo a soluzioni proteiche e/o comunque rese tali per semplice aggiunta di estratto di carne e/o utilizzando come eluente nella prima fase di concentrazione-eluizione soluzioni proteiche, ad es. estratto di carne. Particolare cura deve essere posta nella scelta dell'estratto di carne come flocculante. Sono state notate differenze significative tra le diverse case produttrici così come tra i diversi lotti di una stessa casa. Esistono in commercio degli estratti di carne preparati e consigliati per la flocculazione organica.

Portare la soluzione proteica a pH 3,5±0,2. Mantenere la soluzione in agitazione lenta per 30' e centrifugare il campione a 3.500 g/30'/4°C. Risospendere il pellet con una soluzione sterile di 0,15 M Na_2HPO_4 pH 9,5. Dopo dissoluzione del pellet il pH è riportato a 7,2±0.2. Decontaminare il campione prima dell semina su sistemi cellulari

5.2. Precipitazione con polietilenglicole 6000.

Addizionare al campione PEG al 50% in rapporto di 1:4 (v/v) (concentrazione finale 10%). Mettere il campione in agitazione lenta con barretta magnetica a circa 4°C per una notte, quindi centrifugare a 10.000g/4°C/45'. Risospendere il pellet nel minor volume possibile di PBS sterile pH7,2±0,2

I tempi di centrifugazione sono proporzionali ai volumi da centrifugare, in genere per volumi da 50 a 100 mL sono necessari 45÷60 min. Per volumi superiori (200÷250 mL) si può arrivare anche alle 2 h.

La precipitazione con PEG, che richiede l'utilizzo di una centrifuga ad alta velocità, è un processo meno drastico rispetto alla flocculazione organica.

6. Estrazione-concentrazione da fanghi di risulta

Al momento non esiste una metodica universalmente accettata, sebbene generalmente tutte utilizzano, per l'eluizione dei virus dalla fase solida, soluzioni proteiche concentrate a pH compreso tra 9,0 ed 11,5. I fanghi sono mescolati con 3÷9 volumi di eluente e dopo agitazione violenta e centrifugazione, l'eluato, contenente i virus enterici, è concentrato con metodiche simili a quelle descritte per le acque.

6.1. Estrazione con il metodo EPA

Questa è la metodica di riferimento proposta dall'agenzia americana per l'ambiente (EPA).
Addizionare a 100 ml di fanghi *cloruro di alluminio 0,05 M* in rapporto 1:10 (concentrazione finale pari a 0,005M*)*. Portare il pH a 3,5, agitare vigorosamente per 30' e centrifugare a 2.500g/15'/4°C. Risospendere il pellet in 100 mL di *estratto di carne al 10% pH7.0± 0,2* ed agitare per 30', centrifugare a 10.000g/30'/4°C. Recuperare il supernatante e diluire con acqua distillata l'estratto di carne presente fino a concentrazione finale del 3% . Riconcentrare l'eluato mediante flocculazione organica o con polietilenglicole 6000.

6.2. Metodo diretto dell'estratto di carne

Aggiungere ad ogni volume di fanghi 3÷10 volumi di *estratto di carne al 3% pH 9,5*. Agitare per 15÷20' controllando ed aggiunstando, se necessario, il pH al valore di 9,5. Centrifugare a 6.000g/15÷30'/4°C. Raccogliere il supernatante e riconcentrare l'eluato mediante flocculazione organica o con polietilenglicole 6.000.

7. Decontaminazione del campione

Prima della semina dei campioni su colture cellulari è assolutamente indispensabile eliminare i batteri che sono inevitabilmente presenti in ogni campione ambientale. Possono essere utilizzati diversi metodi, ma per semplicità di esecuzione e basso costo saranno riportati solo i due metodi più utilizzati: la decontaminazione per filtrazione o con cloroformio.

7.1. Decontaminazione per filtrazione

Esistono in commercio filtri da 0,22 µm già pre-assemblati ed a basso adsorbimento proteico. Il diametro del filtro può variare in base alla torbidità ed al volume del campione.
Filtrare, utilizzando una siringa sterile, 4÷5 mL di *estratto di carne al 3% a pH 7,0± 0,2* od altra soluzione proteica, ad es. *terreno di mantenimento per cellule* al fine di prevenire l'adsorbimento aspecifico dei virus. Filtrare il campione e raccoglierlo in un contenitore sterile. Aggiungere il *Pool di antibiotici* in rapporto 1:50 ed incubare 2 h a 37±1°C.

7.2. Decontaminazione con cloroformio

Aggiungere al campione cloroformio a concentrazione finale pari al 30%. Agitare vigorosamente per 15÷20' e centrifugare a 3.500 rpm per 15' a temperatura ambiente. Prelevare accuratamente e sterilmente la fase acquosa e aggiungere alla fase acquosa *un pool di antibiotici* in rapporto 1:50. Mettere il campione per 2 h a 37±1°C.

8. Isolamento ed identificazione di enterovirus

I metodi per la ricerca degli enterovirus da campioni ambientali comprendono diversi sistemi: sistemi biologici (inoculazione su colture cellulari), sistemi immunologici (immunofluorescenza diretta ed indiretta, test immunoenzimatici, test radioimmunologici) e sistemi molecolari (sonde molecolari o probes, test di reazione a catena della polimerasi).
Molti di questi test sono già commercializzati ma, in alcuni casi, richiedono una certa esperienza da parte dell'operatore. Tutti i test immunologici si basano sull'utilizzo di un anticorpo marcato con radioattivo, fluoresceina o con un enzima.

8.1. Materiali

8.1.1. Terreni di coltura

Stock 10x

In commercio sono disponibili sia terreni già pronti che in polvere. Questi ultimi richiedono la reidratazione della polvere in acqua ultrapura, utilizzando 1/10 del volume indicato al fine di ottenere una soluzione 10x.

Mettere ad agitare la polvere, dopo aver aggiunto 1 mL del *pool di antibiotici*, per almeno 2 h. Sterilizzare per filtrazione a pressione positiva utilizzando un gas inerte come l'azoto; alcuni terreni possono essere sterilizzati in autoclave. La composizione del terreno può variare a seconda delle esigenze nutrizionali delle cellule o a seconda del loro utilizzo (con o senza rosso neutro). Il terreno così preparato può essere conservato a circa +4°C per non più di 6 mesi.

Siero di vitello fetale

Sebbene sia indicato sui flaconi di siero di vitello l'assenza di micoplasmi è comunque opportuno trattarli a 56 ±1°C per 45'.

Pool di antibiotici

La composizione che viene indicata è una miscela ricca che può essere variata a seconda delle necessità, ad es. aggiungendo antimicoplasmi in caso di presente o accertata contaminazione delle linee cellulari.

Composizione:			
	Kanamicina	0,5	g
	Streptomicina	6	g
	Penicillina	5	milioni di unità
	Micostatin	0,16	milioni di unità
	acqua ultrapura	50	mL

Agitare la miscela con barretta magnetica per diverse ore e sterilizzare per filtrazione a pressione positiva. Distribuire la miscela in aliquote di 3÷5 mL, congelare a -20±1°C ed utilizzare entro 6 mesi.

Bicarbonato di sodio all'8%

bicarbonato di sodio	32	g
acqua ultrapura per colture cellulari	400	ml

Agitare con barretta magnetica per 30' e sterilizzare per filtrazione positiva.
Il bicarbonato deve essere conservato a +4°C, in flacone chiuso ed al riparo dalla luce. Non può essere conservato a lungo (massimo 3÷4 settimane). Al momento dell'aggiunta al terreno di coltura si deve notare un viraggio di colore che può andare dal rosso pallido al rosso più intenso (dipende dalla costituzione del terreno); un viraggio verso il viola depone per uno scarto immediato sia dello stock di bicarbonato che del flacone di terreno al quale il bicarbonato stesso è stato aggiunto.

Glutamina al 3%

glutamina	12	g
acqua ultrapura	400	mL

Agitare con barretta magnetica per almeno 30' e sterilizzare per filtrazione positiva. Distribuire in aliquote e congelare a becco di clarino a -20±1°C. Può essere conservata per non più di 6 mesi.

8.1.2. Terreni di crescita e di mantenimento

I terreni di crescita sono utilizzati per la moltiplicazione delle cellule, diversamente i terreni di mantenimento sono utilizzati su monostrati cellulari già formati.

Terreno di crescita al 10% di siero di vitello fetale

acqua ultrapura preventivamente sterilizzata in autoclave (121°C/15')	400	mL
terreno 10x specifico per la linea cellulare utilizzata	50	mL

siero di vitello fetale inattivato	50	mL
antibiotici	0,5	mL
bicarbonato sodico all'8%	7	mL
glutamina al 3%	5	mL

Etichettare accuratamente la bottiglia di terreno indicando: tipo di terreno, percentuale di siero di vitello fetale, linea cellulare e data di preparazione.
Il terreno 10x può variare a seconda delle esigenze nutrizionali delle diverse linee cellulari; alcune richiedono terreni particolarmente arricchiti, ad es. zuccheri, aminoacidi non-essenziali. Può essere conservato a circa 4°C per non più di 6 mesi. È bene comunque prima del suo utilizzo controllare l'assenza di crescita batterica che si evidenzia con un precipitato sul fondo della bottiglia.

Terreno di mantenimento al 2% di siero di vitello fetale

acqua ultrapura sterile preventivamente sterilizzata in autoclave (121°C/15')	420	mL
terreno 10x specifico per la linea cellulare utilizzata	50	mL
siero di vitello fetale inattivato	10	mL
antibiotici	0,5	mL
bicarbonato sodico all'8%	14	mL
glutamina al 3%	5	mL

Etichettare la bottiglia come per il terreno di crescita.
I terreni sia di crescita che di mantenimento vanno utilizzati entro 2 mesi dalla data di preparazione.

Terreno di mantenimento doppio concentrato.

acqua ultrapura sterile	340	mL
terreno 10x specifico per la linea cellulare utilizzata e privo di rosso neutro	100	mL
siero di vitello fetale inattivato	20	mL
antibiotici	1	mL
bicarbonato sodico all'8%	28	mL
glutamina al 3%	10	mL

Etichettare la bottiglia come per il terreno di crescita. Il terreno va utilizzato entro 2 mesi dalla data di preparazione.

Agar per colture cellulari all'1,8%

agar per colture cellulari	1,8	g
acqua ultrapura	100	mL

Sterilizzare in autoclave (121°C/15'). Può essere conservato a circa 4°C per non più di 6 mesi. Se l'agar è troppo vecchio si può notare una certa difficoltà a solidificare.

Rosso neutro all'1%

Rosso neutro	1	g
NaCl	8,5	g
Acqua ultrapura	100	mL

Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica e sterilizzare in autoclave (121°C/15'). Distribuire sterilmente in aliquote. Può essere conservato a temperatura ambiente per non più di 6

mesi. Non agitare mai prima dell'uso al fine di evitare la risospensione di eventuali cristalli di colore che potrebbero interferire con la lettura.

8.2. Colture cellulari

I virus umani sono parassiti strettamente endocellulari, quindi necessitano di cellule su cui moltiplicarsi. Alcuni virus, come i Poliovirus, possono moltiplicarsi su diverse linee cellulari, mentre altri virus presentano una specificità cellulare stretta. Infine, per un terzo gruppo di enterovirus, non esiste al momento una linea cellulare adatta e non sono quindi evidenziabili se non con altri sistemi più sofisticati delle colture cellulari. Alcuni virus, capaci di moltiplicarsi su sistemi cellulari, sono in grado di indurre un tipico effetto citopatico (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri (Epatite A, Rotavirus) possono moltiplicarsi senza indurre alcuna alterazione evidente. In quest'ultimo caso la loro presenza può essere svelata solo con test immunologici (immunofluorescenza diretta o indiretta, test immunoenzimatici, test radioimmunologici) o di biologia molecolare (ibridazione, reazione a catena della polimerasi).
È buona norma, che tutti i laboratori di virologia ambientale, abbiano a disposizione più di una linea cellulare a seconda del virus che si intende ricercare. Le linee cellulari sono classificabili in tre gruppi: cellule di primo espianto, linee cellulari continue (le più utilizzate) e cellule diploidi.
Le cellule vengono fatte crescere su supporti solidi (fiasche) in plastica speciale per colture cellulari di dimensioni variabili da 12,5 cm^2 sino a 175 cm^2, o in roller (fiasche tonde in rotazione continua) da 500 cm^2. Le cellule possono essere anche coltivate in tubi, in piastre da 2 a 96 pozzetti od in capsule di Petri in genere da 45 a 90 mm di diametro.
Qui di seguito verranno solamente descritte le principali procedure di isolamento dei virus da campioni ambientali. Le modalità di coltivazione, di subcoltivazione, di congelamento in azoto liquido per il mantenimento a lungo termine delle linee cellulari sono estremamente complesse e prima di avventurarsi al loro uso e mantenimento per campioni ambientali si rimanda sia a specifici trattati in materia che a necessari training in laboratori specializzati.

8.3. Inoculo su colture cellulari

La ricerca di enterovirus può effettuarsi per isolamento su colture cellulari in vitro, per tecniche immunologiche e per test di biologia molecolare.
I campioni comunque concentrati presentano una notevole quantità di batteri che vanno eliminati prima dell'inoculo su cellule. Inoculare 0,5 mL di campione per fiasche da 25 cm^2 ed aggiungere ugual volume di terreno di mantenimento (diluizione finale 1:2). La quantità di campione che può essere inoculato su monostrati cellulari dipende strettamente dalla tossicità del campione ed in alcuni casi è consigliabile ricorrere a diluizioni superiori (1:7÷1:10) come nel caso dei fanghi di risulta.

8.4. Isolamento di virus citopatici

L'isolamento su monostrato cellulare può essere effettuato in due modi.
Dopo inoculo del campione sul monostrato cellulare e successivo adsorbimento del virus si può aggiungere: terreno liquido o addizionato ad agar.

8.4.1. Inoculazione su monostrati in terreno liquido

Prepare monostrati cellulari in fiaschette da 25 cm^2 o superiori. Eliminare il terreno di crescita e inoculare il campione precedentemente trattato. Lasciare a contatto il campione (adsorbimento) per 1÷2 ore a 37±1°C in agitazione lenta ma continua utilizzando un agitatore basculante. Osservare al microscopio invertito l'eventuale effetto tossico del campione (distruzione del monostrato non imputabile a virus). In caso di elevata tossicità, l'inoculo del campione va ripetuto, su nuovo monostrato, a diluizione maggiore. In caso di assenza di tossicità, eliminare l'inoculo e lavare il monostrato cellulare *con terreno di mantenimento al 2% di siero di vitello fetale* o soluzione salina sterile. Aggiungere 6÷7 mL di terreno di mantenimento per fiasche da 25 cm^2, incubare a 37±1°C ed osservare le cellule giornal-

mente al fine di evidenziare un effetto citopatico da virus. Dopo una notte di incubazione si può presentare un effetto tossico ritardato, seppur minimo.
È' necessario affiancare alle analisi in corso, almeno 2 fiaschette di cellule non infettate e trattate allo stesso modo delle cellule infette (controllo cellule).
Le colture debbono essere osservate per almeno 2 settimane. L'effetto citopatico da virus deve essere confermato con un secondo passaggio inoculando un aliquota del lisato cellulare del primo passaggio (previo congelamento e scongelamento per almeno tre volte) su un nuovo monostrato cellulare.

8.4.2. Inoculazione su monostrati in presenza di terreni agarizzati
Questa tecnica può essere applicata solo per quei virus che provocano placche visibili di lisi (distruzione del tappeto cellulare).

8.4.2.1. Metodo delle placche in presenza di colorante vitale
Preparare monostrati cellulari su capsule di Petri da 60÷90 mm di diametro, trattare il campione ed inoculare come descritto in 8.4.1., incubando le capsule in atmosfera di 5% di CO_2. Eliminare l'inoculo e lavare il tappeto con soluzione salina sterile, aggiungere 10 mL di *terreno di mantenimento doppio concentrato* addizionato con *agar per colture cellulari all'1,8%* (1:1). Dopo solidificazione aggiungere un secondo strato di terreno doppio concentrato agarizzato contenente *rosso neutro allo 0,1%*. Dopo solidificazione del secondo strato incubare le piastre a 37±1°C in atmosfera di $C0_2$ al 5%.
Il colorante vitale determina una colorazione rosso pallido del monostrato integro, mentre le placche di lisi sono visibile come foci rotondi non colorati.

8.4.2.2. Metodo delle placche in assenza di colorante vitale
Eseguire il trattamento, l'inoculo, l'aggiunta del terreno agarizzato (senza colorante vitale) e l'incubazione come riportato in 8.4.2.1.
Dopo un intervallo di tempo variabile in base ai virus enterici citopatici che si intende ricercare, coprire il terreno agarizzato con 5÷10 mL di *rosso neutro allo 0,1%* in terreno di mantenimento. Lasciare 1 h o più, a seconda della linea cellulare, a 37±1°C in atmosfera di CO_2 al 5%. Eliminare l'eccesso di colorante ed evidenziare le placche in controluce. Il colorante vitale determina una colorazione rosso pallido del monostrato integro, mentre le placche di lisi sono visibili come foci rotondi non colorati.

8.5. Isolamento di virus che non provocano effetto citopatico
Alcuni virus possono moltiplicarsi senza indurre un'alterazione visibile del tappeto cellulare (Rotavirus), altri virus crescono con estrema difficoltà e con tempi di incubazione lunghi anche diverse settimane, ad es. Epatite A.
Tutti questi virus possono essere messi in evidenza con tecniche immunologiche: immunofluorescenza diretta o indiretta, radioimmunologici.
Verrà descritto solo il metodo dell'immunofluorescenza in quanto il metodo radioimmunologico è simile al primo con la differenza della marcatura radioattiva dell'anticorpo. Nel test di immunofluorescenza l'anticorpo è marcato con fluoresceina (sostanza fluorescente).
Ogni test deve sempre comprendere dei controlli negativi (cellule non infettate) e controlli positivi (cellule infettate con ceppi virali noti di laboratorio)

8.5.1. Metodo dell'immunofluorescenza diretta
Preparare il monostrato cellulare su vetrini per immunofluorescenza, inoculare il campione come nell'inoculo su monostrati con terreno liquido, incubare i vetrini in atmosfera di CO_2 al 5% per un tempo variabile dipendente dal periodo di replicazione del virus. lavare il monostrato cellulare con *PBS senza calcio e magnesio* e fissare il vetrino per 10÷15' in acetone a freddo (-20±1°C). Lavare in PBS e asciugare all'aria, aggiungere un anticorpo fluoresceinato e specifico contro un antigene virale che si intende ricercare (45' a 37±1°C ed in camera umida). lavare il vetrino in PBS ed esaminarlo con un microscopio a fluorescenza.

La positività è data da punti verdi fluorescenti in genere intracitoplasmatici. La positività può essere espressa come percentuale di cellule infette o numero di foci fluorescenti.

8.5.2. Metodo dell'immunofluorescenza indiretta
Il metodo prevede l'utilizzo di due anticorpi: il primo anticorpo è un'immunoglobulina non marcata e specifica verso un determinato virus; il secondo anticorpo è un'anti-immunoglobulina marcata con fluoresceina. In commercio sono reperibili entrambi i tipi di anticorpi.
La preparazione del tappeto cellulare, l'infezione e il fissaggio viene eseguita come nel test precedente
Aggiungere il primo anticorpo ed incubare per 45' a 37±1°C in camera umida, lavare 2 volte con soluzione salina e aggiungere il secondo anticorpo marcato con fluoresceina (45' a 37±1°C in camera umida). Lavare con soluzione salina ed osservare al microscopio a fluorescenza.
La positività viene espressa come nel caso dell'immunofluorescenza diretta.

8.5.3. Metodo immunoenzimatico
Nel metodo immunoenzimatico (test ELISA) l'anticorpo specifico verso un determinato antigene è adeso alla fase solida (piastre per test ELISA a 96 pozzetti). Esistono ormai in commercio numerosi test enzimatici per la ricerca dei virus isolabili dall'ambiente.
Viene descritto un metodo standard di tipo diretto per la ricerca del virus dell'epatite A. In ogni test vanno sempre inclusi almeno due controlli positivi e due negativi forniti nel kit commerciale insieme alle soluzioni specifiche da utilizzare nel test.
Lavare il pozzetto con la soluzione di lavaggio, mettere 100 μL del campione in esame, incubare per 16±2 h a temperatura ambiente in camera umida. Lavare i pozzetti per almeno 3 volte con 300 μl di soluzione di lavaggio fornita nel kit. Mettere 100 μl dell'anticorpo marcato, incubare a 37±1°C per 1 h in camera umida e lavare almeno 3 volte con 300 μl della soluzione di lavaggio. Aggiungere 100 μl di una soluzione contenente un appropriato substrato specifico per l'enzima legato all'anticorpo, lasciare 30' a temperatura ambiente in camera umida. Bloccare la reazione con 100 μl di una soluzione acida fornita nel kit.
L'avvenuto legame anticorpo-antigene (positività) è evidenziato dallo sviluppo di una reazione cromatica tra substrato ed enzima.
I campioni sono considerati positivi sulla base delle indicazioni fornite dalla casa produttrice.

9. Test di biologia molecolare
Tali test possono essere applicati sia al campione concentrato (senza passaggio su monostrati cellulari) che dopo passaggio su cellule.
Negli anni più recenti accanto ai tradizionali test si sono sviluppati metodi di analisi biologico-molecolare: le sonde molecolari o probes sia a DNA (acido deossiribonucleico) che RNA (acido ribonucleico) (test di ibridazione) e più recentemente la reazione a catena della polimerasi (PCR). Tali tecniche hanno ricevuto un notevole sviluppo, sebbene entrambe non siano in grado di discriminare tra particelle virali infettive e non.
Le sonde molecolari sono costituite da RNA o DNA complementare ad una sequenza specifica ed unica del genoma virale. Tali sonde, come nel caso degli anticorpi, sono marcate con enzimi o con isotopi radioattivi. L'uso delle sonde molecolari per la ricerca degli enterovirus ha avuto il merito di avere introdotto tecniche di biologia molecolare nel campo ambientale, ma presenta un unico limite legato alla loro sensibilità che le rende applicabili solo ad acque con alto titolo virale (limite di sensibilità: 10^3 particelle virali infettive).
Il test di reazione a catena della polimerasi (PCR) consiste in un'amplificazione selettiva di una porzione unica e specifica del genoma secondo una relazione del tipo 2^n, con n uguale al numero di cicli di amplificazione. Alla fine del test la sequenza è stata copiata da appositi enzimi fino ad un massimo di 10^6 copie. L'amplificato può essere successivamente risolto ed identificato sia su gel di agarosio, in quanto essendo nota la sequenza se ne conosce anche dimensione e peso molecolare, sia mediante test di ibridazione molecolare su supporto solido utilizzando apposite sonde marcate (test di ibridazione).

Il limite di sensibilità del test è compreso tra 3÷30 particelle virali infettive, sebbene, in teoria, anche una singola particella virale può essere rivelata con il test di reazione a catena della polimerasi (PCR). Sebbene tale test sia oramai largamente accettato esistono anche in questo caso diversi problemi legati soprattutto alla presenza di inibitori aspecifi e non delle reazioni enzimatiche. Diverse procedure sono state adottate al fine di eliminare tali inibitori dal campione ambientale; è bene comunque considerare che ogni tecnica deve essere sempre attentamente valutata in laboratorio ed adattata alle personali esigenze.

Bibliografia

BITTON G., (1989), *Introduction to environmental virology.* John Wiley and sons (Eds), New York.

CLARK C.S., BJOMSON H.S., SCHWARTZ-FULTON J., HOLLAND J.W., GARISIDE P.S., (1984), *Biological heath risks associateci with composting of wastewater treatment plant sludge.* J. Wat Pofi Control Fed 56, 1269-1276.

DIVIZIA M., SANTI A.., PANÀ A., (1989), *Ultrafiltration an efficient second step for hepatitis A virus and poliovirus concentration.* J. Virol Meth 23, 55-62.

DIVIZIA M., RUSCIO V., DEGENER A.M., PANÀ A., (1998), *Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization.* Microbiologica 21, 161-167

DIVIZIA M., MORACE G., GABRIELI R., PISANI G., PANÀ A., (1993), *Application of the PCR technique to the detection of hepatitis A virus in the environrnent.* Wat. Sci. Tech. 27 (34),223-225.

LEWIS G.D., METCALF T.G., (1988), *Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human Rotavirus.from oyster and sediment samples.* Appl Environ Mcrobiol 51, 1983-1988.

MALINA J.F., RANGAFIATHNA K.R., MOORE B.E., SGIK B.P., (1974), *Virus survival in water and wastewater systems.* Centre for research in water resources Austin, USA.

SHUVAL I.R., (1982), *Health risks associated with water recycling.* Wat Sci Techn 14, 1-10.

STROFFOLINI T., BIAGINI W., LORENZONI L., PALAZZASI G.P., DIVIZIA M., LONGILLO R., (1990), *An outbreak of hepatitis A in young adults in centrai Italy.* Eur J. Epidemiol 6(2), 156-159.

TIMOTHY E.M., (1984), *Outbreak of infective hepatitis among sewage sludge spreaders.* CDR 20.

BATTERIOFAGI

1. Introduzione

I batteriofagi, per le loro caratteristiche chimico-fisiche e biologiche simili a quelle dei virus animali, sono stati utilizzati come modello di studi sulle interazioni virus-cellula ospite. La loro struttura è costituita da una molecola di acido nucleico racchiusa in un involucro protettivo proteico.
Il Comitato Internazionale di tassonomia dei virus ha classificato i batteriofagi in 11 famiglie. La loro morfologia può essere estremamente semplice (Leviviridae): un capside icosaedrico con una sola proteina ed una RNA-polimerasi associata all'RNA, oppure, come per le Myoviridae, molto complicata: un capside icosaedrico legato, tramite un anello, ad una coda contrattile.
I batteriofagi possono moltiplicarsi esclusivamente all'interno della cellula batterica ospite metabolicamente attiva e competente. Le loro modalità replicative non differiscono da quelle dei virus animali.
I dati riguardanti la distribuzione nell'ambiente dei fagi sono ancora frammentari ma è possibile individuare la loro presenza in tutti i mezzi ove è presente una forma di vita batterica. Qualunque sia il loro habitat, esiste una popolazione fagica di batteri autoctoni ed una popolazione fagica proveniente da altri ambienti. L'interesse maggiore è rivolto a questa seconda categoria di fagi.
In particolare, per quel che riguarda gli ambienti acquatici, le informazioni più importanti riguardano la presenza di fagi infettanti i batteri del genere *Escherichia coli* (colifagi); ciò è dovuto all'interesse che essi ricoprono in qualità di indicatori potenziali di una contaminazione virale di origine fecale.
La loro distribuzione nel tratto digerente dell'uomo e degli animali è stata più volte studiata ed è stato dimostrato che il 23,5 % di campioni di feci umane contiene colifagi con una concentrazione pari a 10^5 UFP/g di feci. Un altro batteriofago presente in grande quantità nel tratto intestinale è il fago specifico del *Bacteroides fragilis*, batterio anaerobio .
Sono pochi i dati informativi sulla concentrazione dei batteriofagi specifici delle specie batteriche acquatiche. Nelle acque dolci sono stati ritrovati più di 10^3 fagi L^{-1} capaci di infettare le specie batteriche autoctone, fagi specifici di batteri patogeni per i pesci ed, infine, numerosi fagi di batteri saprofiti o patogeni per l'uomo e gli animali.
Nelle acque di mare i dati riportati in letteratura evidenziano una presenza di batteriofagi specifici di batteri sia autoctoni che patogeni per gli animali marini, nonchè la presenza in quantità notevole di fagi di batteri enterici, in particolare colifagi.
Per quanto riguarda i sedimenti, sia di acque dolci che marine, i fagi tendono ad accumularvisi ad una concentrazione più alta rispetto alla colonna di acqua sovrastante. Ciò è in relazione alla loro capacità di adsorbirsi ad un supporto solido, che ne favorisce la protezione dalle varie aggressioni dell'ambiente (inattivazione) e quindi la loro sopravvivenza.
Un aspetto importante è la capacità di moltiplicazione dei fagi nell'ambiente. I fagi infettanti i batteri autoctoni si replicano nell'ambiente in funzione della presenza del batterio ospite, dell'età fisiologica del batterio stesso e della densità rispettivamente del batterio ospite e del fago.
Per i fagi specifici dei batteri alloctoni invece, la situazione è meno chiara. Una moltiplicazione nell'ambiente è stata osservata sia per i colifagi somatici, che riconoscono il loro recettore di attacco sulla superfice esterna del corpo batterico, che per i colifagi F specifici, che utilizzano come recettore il sex-pilus. La ragione di tale fenomeno è intuibile per i colifagi somatici in quanto questi, allo stesso modo del loro batterio ospite, sono in grado di moltiplicarsi a temperature relativamente basse (15°C÷45°C) quali quelle riscontrabili in un ambiente idrico. I colifagi F-specifici possono infettare invece soltanto le cellule di *Escherichia coli* che hanno sintetizzato il loro sex-pilus. La sintesi di questo recettore è possibile a temperature superiori a 30° C, ragion per cui è presumibile che la moltiplicazione nell'ambiente di questi fagi è realizzabile soltanto se il loro batterio ospite ha sintetizzato precedentemente il sex-pilus nell'intestino degli omeotermi prima di essere versato nel mezzo idrico.
I fagi che infettano il *Bacteroides fragilis*, infine, non sono in grado di moltiplicarsi nell'ambiente in quanto il loro batterio-ospite è metabolicamente attivo soltanto in condizione di anaerobiosi ed in pre-

senza di alcuni fattori di crescita specifici. Tali condizioni non sono riproducibili in un ambiente idrico.
I batteriofagi sopravvivono nell'ambiente idrico più a lungo dei batteri autoctoni ed in particolare dei batteri indicatori di contaminazione fecale. Allo stesso modo dei virus animali la durata della loro sopravvivenza dipende dalla presenza di sostanza organica nel mezzo e dalla loro associazione con le particelle solide, dalla temperatura, dalla loro esposizione ai raggi ultravioletti, dal pH, ecc. La loro ubiquitarietà, soprattutto per quelli provenienti dall'uomo e dagli omeotermi, ha suggerito il loro utilizzo quali indicatori di contaminazione fecale.
Nel corso dell'ultimo decennio i batteriofagi sono stati proposti come indicatori di contaminazione virale dei mezzi idrici ed anche come indicatori di efficacia dei processi di depurazione e disinfezione delle acque.
Le motivazioni che suggeriscono l'utilizzo dei colifagi come indicatori della presenza di virus umani nell'ambiente possono essere così schematizzate:

- I fagi si trovano in abbondanza nelle acque contaminate.
- Le popolazioni dei colifagi sono più abbondanti che quelle degli enterovirus.
- I colifagi sono incapaci di riprodursi senza il batterio ospite.
- I colifagi possono essere isolati e quantificati con metodi semplici e poco costosi.
- I tempi di risposta sono più brevi che per gli enterovirus.
- Alcuni colifagi sono più resistenti degli enterovirus all'inattivazione e alla disinfezione.

Alcuni Autori, in seguito a recenti studi, hanno proposto l'uso del fago specifico del *Bacteroides fragilis* come indicatore di contaminazione fecale. Questi fagi sono specifici del tratto digerente umano e per quanto detto poc'anzi non si replicano nell'ambiente. Nelle feci umane sono meno abbondanti dei colifagi.

La ricerca dei batteriofagi in campioni di acque reflue e fanghi di risulta richiede una serie di operazioni, così come per gli enterovirus, che deve essere adattata al tipo di fago che si intende ricercare. Benchè la quantità dei fagi in un ambiente idrico è di granlunga superiore a quella degli enterovirus, in alcuni tipi di campioni è necessaria una concentrazione di essi. A tutt'oggi non si dispone di metodiche di laboratorio standardizzate per il recupero dei fagi dall'ambiente, per cui i metodi applicati al momento riflettono dell'esperienza di ogni Autore. La maggior parte dei metodi utilizzati per concentrarli si basa sul principio dell'adsorbimento su diversi materiali così come avviene per i virus animali. In una seconda fase si provvede ad eluire in un piccolo volume i fagi adesi al materiale adsorbente. È importante tener conto di alcune caratteristiche dei fagi, in particolare la loro sensibilità al pH. Alcuni colifagi presenti nell'acqua sono inattivati a pH 11,5; il fago specifico del *B. fragilis* è sensibile invece a valori di pH vicini a 3,0, che generalmente vengono impiegati in alcuni metodi di concentrazione. Per questi motivi è bene utilizzare dei metodi che non prevedono l'uso di eluenti con valori di pH estremi. Il metodo proposto é l'adsorbimento-eluizione su membrane piane.

2. Volumi da analizzare

La diversa natura dei campioni ambientali impone delle differenze nella scelta dei volumi da sottoporre ad analisi, che tengono conto del grado di inquinamento, accertato o presunto; cosicchè per le acque reflue, i volumi variano da pochi mL a 2÷3 L in base al trattamento depurativo subito (acque reflue rispettivamente in entrata e in uscita dagli impianti di depurazione).

3. Metodo di concentrazione per adsorbimento-eluizione

Questo metodo consente di concentrare i fagi presenti in un volume massimo di 2÷3 L di acqua in un volume finale di eluente pari a 3÷5 mL.

3.1. Reagenti

Estratto di carne al 3%, pH 9,5 (eluente)

Composizione:	Estratto di carne	3	g
	Acqua distillata	100	mL
	pH 9,5±0,2		

In una beuta sterile reidratare la polvere, provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio (NaOH) 1 N. Sterilizzare in autoclave per 15' a 121 °C.

Estratto di carne al 10%, pH 9,0

Composizione:	Estratto di carne	10	g
	Acqua distillata	100	mL
	pH 9,0±0,2		

In una beuta sterile reidratare la polvere, provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio (NaOH) 1 N. Sterilizzare in autoclave per 15' a 121 ° C .

3.2. Filtri elettronegativi

Questo modello di membrane filtranti presenta una superficie a carica elettrica negativa, che ai valori di pH prossimi alla neutralità respinge le particelle virali. Riducendo i valori di pH intorno a 3,5 si ottiene una inversione della carica elettrica superficiale dei virus che ne permette il loro adsorbimento. È possibile migliorare la capacità adsorbente del filtro aggiungendo cationi bi o trivalenti al campione da concentrare. Questa tecnica, largamente utilizzata per il recupero degli enterovirus da campioni ambientali, può essere applicata per il recupero dei batteriofagi ma con un minor rendimento; molti fagi infatti sono rapidamente inattivati dai bassi valori di pH. Adottando dei valori di pH leggermente più alti (da 3,8 a 4,0) ed effettuando un accurato controllo di esso durante le singole fasi della procedura di recupero, si ottengono risultati più soddisfacenti. Per valori di pH intorno a 6,0 ed in presenza di ioni Mg^{2+} a concentrazione 0,2 M è stato dimostrato un maggior rendimento. Dopo aver filtrato il campione per pressione positiva attraverso il filtro, si procede alla eluizione con un piccolo volume (da 3 a 5 mL) di una soluzione ad alta concentrazione di proteine (3% di estratto di carne) con un valore di pH intorno a 9,0. L'eluato viene neutralizzato velocemente con HCl 1 N. Il concentrato ottenuto è pronto per essere analizzato.

3.3. Filtri elettropositivi

Ottimo è l'adsorbimento dei fagi ai filtri elettropositivi, piuttosto difficile risulta invece la loro completa eluizione. I migliori risultati si ottengono adottando come eluente una soluzione di estratto di carne al 3% con un valore di pH compreso tra 7,0 e 9,0.

Una delle metodiche già descritte in letteratura prevede l'uso di filtri elettropositivi del tipo VIROSORB 1 MDS. In commercio è comunque possibile reperire altri tipi di filtri a carica superficiale modificata.

Il campione viene filtrato per pressione positiva attraverso un pacchetto di tre filtri 1MDS. I fagi adsorbiti vengono eluiti con 20 mL di estratto di carne al 10% pH 9,0, e l'eluato raccolto, neutralizzato con HCl 1N. L'eluato, mescolato con due volumi di una soluzione satura di ammonio è centrifugato per 20' alla temperatura di 4°C a 14.500 rpm. Il pellet è quindi risospeso in 2 mL di acqua distillata sterile.

3.4. Altri Filtri

Si tratta di membrane filtranti di materiale inorganico con diametro di 47 mm e con porosità di 0,1 o 0,2 µm del tipo ANODISC™, con bassa attività legante le proteine e che non presentano cariche elettriche di superficie. Consentono di concentrare il campione in condizioni di pH neutro ottimali per il B40-8 (*fago del Bacteroides fragilis*).

4. Metodo di concentrazione per Ultrafiltrazione a Flusso tangenziale

L'ultrafiltrazione è un processo di separazione delle particelle in funzione del solo peso molecolare; esistono diverse membrane e cartucce con tagli molecolari (nominal molecular weight limit) da 1.000 sino a 1.000.000 di dalton. La funzione della membrana è quella di porre una barriera tra le sostanze che riescono ad attraversare le membrane e le altre, a peso molecolare più elevato rispetto al taglio molecolare (cut-off), che sono ritenute, ad es. i virus. Nel caso specifico i batteriofagi vengono concentrati non per adsorbimento su membrane, ma per riduzione progressiva del volume del campione dovuto a perdita di acqua, sali e soluti in base al cut-off scelto. La membrane attualmente in commercio sono di due tipi: cellulosa rigenerata e polisulfone.
Si consiglia l'uso di membrane con taglio molecolare pari a 100.000 dalton.

4.1. Reagenti

Estratto di carne al 3% pH 7,2

Composizione:	Estratto di carne	3	g
	Acqua distillata	100	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica. Controllare il pH ed eventualmente portarlo al valore desiderato aggiungendo NaOH 1N o HCl 1 N. Sterilizzare in autoclave (121°C per 15'). La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

Estratto di carne al 3%, pH 9,5 (eluente)

Composizione:	Estratto di carne	3	g
	Acqua distillata	100	mL
	pH 9,0±0,2		

In una beuta sterile reidratare la polvere, provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio (NaOH) 1 N. Sterilizzare in autoclave per 15' a 121 ° C .

Formaldeide allo 0,1%.

Composizione:	Formaldeide	13,5	mL
	Acqua distillata	500	mL

Preparare al momento dell'uso e scartarla dopo l'utilizzo.

Idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N

Composizione:	Idrossido di sodio	4	g
	Acqua distillata	1	L

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione. Scartare dopo l'utilizzo.

Tampone glicina 0,25 M pH 9,5

Composizione:	Glicina	18,76	g
	Acqua distillata	1.000	mL
	pH 9,5±0,2		

In una beuta sterile reidratare la polvere, provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio [NaOH] 1 N. Sterilizzare in autoclave per 15' a 121°C.

La soluzione, se conservata sterilmente può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

4.2. Procedura

Montare l'ultrafiltro secondo le istruzioni della casa produttrice. Lavare l'ultrafiltro con 5÷10 L di acqua distillata al fine di allontanare il liquido conservante.
Pretrattare il sistema con *estratto di carne al 3 % a pH 7,2* facendolo ricircolare per 5', al fine di prevenire l'adsorbimento aspecifico dei fagi eventualmente presenti nel campione.
Far circolare il campione alle seguenti condizioni operative: 10÷12 psi in entrata. Fermare l'apparecchio quando il recipiente del campione è quasi vuoto. In questo caso il volume del campione è rappresentato dal solo volume di riempimento dei tubi e di imbibizione dell'ultrafiltro. Svuotare il sistema completamente e raccogliere il campione.
Lavare l'ultrafiltro con una soluzione di *estratto di carne al 3% pH 9,5±0,2*, utilizzando un volume pari a 3/4 dell'ultraconcentrato. Riunire l'ultraconcentrato con la soluzione di lavaggio. Neutralizzare il pH del campione-concentrato finale con acido cloridrico (HCl) 1 N.
Il campione può essere ulteriormente concentrato se necessario, utilizzando sistemi di ultrafiltrazione in grado di trattare volumi minori.
A fine concentrazione: lavare l'ultrafiltro con 1÷2 L di acqua distillata, far circolare in continuo per almeno 15' una soluzione di NaOH 0,1 N, lavare l'ultrafiltro con 2÷3 L di acqua distillata. A questo punto l'ultrafiltro può essere utilizzato per un nuovo campione o conservato per successive analisi

4.3. Mantenimento e conservazione degli ultrafiltri

Le membrane o cartucce per ultrafiltrazione a flusso tangenziale possono essere utilizzate a lungo e per diversi campioni se adeguatamente rigenerate e conservate.
Lavare l'ultrafiltro con 1÷2 L di acqua distillata, far circolare in continuo per almeno 15' una soluzione di *idrossido di sodio 0,1 N* e lavare l'ultrafiltro con 2÷3 L di acqua distillata. Far circolare in continuo una soluzione di *formaldeide allo 0,1%*. Spegnere la pompa ed estrarre l'ultrafiltro cercando di conservare quanta più formaldeide possibile all'interno dell'ultrafiltro stesso. Mantenerlo a circa +4°C.

5. Metodo di estrazione e concentrazione a partire da fanghi o sedimenti

I batteriofagi, come i virus animali, in ambiente idrico tendono ad associarsi alle sostanze organiche presenti. Il loro recupero comporta quindi, prima della fase di concentrazione, un'ulteriore fase di eluizione dei fagi adsorbiti alle sostanze sedimentabili. Due metodi di eluizione sono consigliati per il recupero dei fagi.

5.1. Tampone glicina pH 9,5

Questo metodo consiste nel mescolare 25 g di sedimento o fango con 75 mL *di tampone glicina 0,25 M, pH 9,5.* Dopo omogeneizzazione ed aggiustato il pH se necessario, il campione viene agitato vigorosamente per 10' e quindi centrifugato a 3.000 rpm per 5' a 4°C. Il supernatante è neutralizzato e filtrato su membrana in nitrato di cellulosa (0,20 µm) precedentemente pretrattata con 20 mL di una soluzione di *estratto di carne al 3%, pH 9,5*. Il filtrato ottenuto rappresenta il nostro campione .

5.2. Estratto di carne al 3% PH 9,5

25 g di sedimento o fango vengono raccolti a 3.500 rpm per 20' a 4°C al fine di eliminare la parte acquosa. Il pellet, mescolato con 3÷6 volumi di una soluzione di *estratto di carne al 3%, pH 9,5*, è posto in agitazione magnetica per 30'. La soluzione è successivamente filtrata utilizzando una membrana in nitrato di cellulosa (0,20 µm) preventivamente trattata con 20 mL di una soluzione di *estratto di carne al 3%, pH 9,5*. Il filtrato ottenuto rappresenta il nostro campione.

6. Tecniche di messa in evidenza dei diversi tipi di batteriofagi

Tutti i campioni di provenienza ambientale contengono una flora batterica propria che può in qualche modo interferire con i metodi di rilevamento dei batteriofagi; pertanto è necessario inattivare o allontanare tale popolazione microbica prima di effettuare la messa in evidenza dei fagi.
La decontaminazione può essere effettuata con metodi diretti, che prevedono o la filtrazione su membrane di nitrato di cellulosa (0,20 µm) preventivamente trattate con estratto di carne al 3%, pH 9,5 oppure il trattamento del campione con 1/3 del suo volume di cloroformio, agitando energicamente per 10' ed allontanando la fase organica. Quest'ultimo trattamento distrugge la maggior parte dei batteri ma non le spore e provoca comunque un'inattivazione parziale dei fagi. I metodi indiretti, invece, possono essere attuati nella fase di rivelazione dei fagi, aggiungendo al mezzo di coltura un antibiotico in grado di inattivare i batteri contaminanti ma non la crescita del ceppo batterico rivelatore; oppure, utilizzando un terreno selettivo che permetta la sola crescita del ceppo batterico rivelatore.
Quest'ultima tecnica è di più difficile attuazione in quanto nel terreno selettivo possono svilupparsi anche i batteri autoctoni. È preferibile quindi addizionare al terreno uno specifico antibiotico verso il quale i batteri rivelatori sono resistenti.
Per quanto riguarda la evidenziazione dei fagi è possibile ricorrere a metodi sia qualitativi che quantitativi.
Il metodo classico utilizzato per stabilire la presenza dei fagi (metodo qualitativo) si basa su una fase di arricchimento del fago e sua successiva messa in evidenza. Questa tecnica consiste nell'aggiungere ad un volume noto di campione da analizzare un egual volume di terreno di coltura idoneo nel quale è stato fatto precedentemente crescere il ceppo indicatore. Dopo incubazione, al fine di favorire la moltiplicazione dei fagi presenti, una piccola quantità della coltura, dopo decontaminazione, viene sottoposta al test di rivelazione.
La ricerca quantitativa delle particelle fagiche in un campione ambientale può essere effettuata in due diversi metodi: il metodo delle placche e il metodo del MPN.
La tecnica delle placche di lisi è quella più usata in laboratorio e deriva dal metodo del doppio strato di agar.
Il metodo quantitativo del MPN non viene qui descritto perché molto laborioso e richiede l'uso di quantità superiori di reagenti e tempi più lunghi di esecuzione.
La tecnica delle placche di lisi consiste nel mescolare un volume noto del campione (massimo 1 mL) da analizzare con del terreno base allo 0,5% di agar (agar molle) mantenuto nella fase liquida, a cui viene aggiunta la sospensione batterica indicatrice specifica per ciascun tipo di batteriofago che si intende ricercare. Dopo leggera agitazione il mix ottenuto viene versato su uno strato di terreno base all'1,5% di agar, precedentemente fatto solidificare in capsule Petri. Dopo incubazione, secondo tempi e modi specificati nei singoli metodi, vengono osservate e quantizzate le placche di lisi, che si manifestano come aree circolari trasparenti nel contesto del terreno opacizzato per effetto della crescita batterica. Ognuna di queste placche corrisponde ad una particella di fago infettivo. Il risultato viene espresso in UFP (Unità Formanti Placca) per volume di campione analizzato.

6.1. Ricerca dei colifagi somatici

Il ceppo indicatore raccomandato è *Escherechia coli CATCC 13706*, ma è anche possibile utilizzare un ceppo derivato da esso purché resistente all'Acido nalidixico. Quest'ultimo viene aggiunto al terreno alla concentrazione finale di 100 mg mL^{-1}, partendo da uno stock precedentemente preparato e sterilizzato per filtrazione.
Al terreno di coltura può essere aggiunto agar-agar nella proporzione variabile secondo l'uso: terreno del primo strato 1,5% di agar; terreno secondo strato (agar molle) 0,5% di agar.

6.1.1. Reagenti
Acido nalidixico:stock

Composizione:	Acido nalidixico	1	g
	Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico sino a completa dissoluzione, sterilizzare per filtrazione con filtri da 0,22 µm. Dividere in aliquote da 1 mL e conservare a –20°C.

Terreno base

Composizione:	Estratto di carne	12	g
	Estratto di lievito	3	g
	Peptone	10	g
	Cloruro di sodio	3	g
	Carbonato di sodio	0,7	g
	Acqua distillata	1	L
	Solfato di magnesio eptaidrato	0,12	g
Sterilizzare a 121°C per 15' e dopo raffreddamento:			
Addizionare:	cloruro di calcio	0,05	g
	pH finale	7,2	
	Agar 1,5% o 0,5% secondo l'uso.		

6.1.2. Analisi qualitativa

Mescolare: 100 mL di campione
100 mL di terreno liquido doppio concentrato
25 mL di una coltura in fase esponenziale di crescita del batterio indicatore (D.O.=0.3 a 620 nm).

Incubare a 37°C per 16÷18 h, prelevare una aliquota (circa 1 mL) della coltura ottenuta e decontaminarla. Aggiungere all'aliquota del campione il 30% di cloroformio; agitare al vortex e centrifugare per 10', 3.000 rpm a temperatura ambiente. Prelevare per l'analisi il supernatante. Mescolare 3 mL di agar molle (terreno di crescita con l'aggiunta di 0,5% di agar) mantenuto a 45°C con 0,2 mL di una brodocoltura del ceppo indicatore in fase esponenziale di crescita. Versare in una capsula di Petri contenente un primo strato agarizzato del terreno di crescita (1,5% di agar). Dopo solidificazione deporre una goccia della coltura decontaminata sulla superfice dell'agar. Lasciare asciugare e incubare a 37°C per almeno 8 ore.
In caso di presenza di fago si osserverà un'area di lisi intorno alla goccia depositata.

6.1.3. Analisi quantitativa

In un tubo sterile mescolare:
2,5 mL di agar molle (0,5% di agar) mantenuto a 45°C;
0,5 mL di una coltura in fase esponenziale del batterio indicatore;
100 µL del campione da analizzare precedentemente decontaminato per filtrazione.

Mescolare e versare su un primo strato di terreno di crescita fatto solidificare in una capsula Petri (1,5% agar). Dopo solidificazione incubare a 37°C.
Le placche sono visibili già dopo 6-8 h di permanenza a 37°C consentendo di effettuare una quantizzazione prima delle 24 h.

6.2. Ricerca dei colifagi F-specifici

Il batterio rivelatore raccomandato per questa ricerca deriva da *Escherichia coli K 12 (Hfr)* che presenta i plasmidi di resistenza per la streptomicina e l'ampicillina.
Il terreno di crescita consigliato è identico a quello descritto per i colifagi somatici sostituendo l'acido nalidixico con i due antibiotici prima detti alla concentrazione di 0,015 g L^{-1} per entrambi.

6.2.1. Reagenti
Streptomicina: stock

Composizione:	Streptomicina	0,15	g
	Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico sino a completa dissoluzione, sterilizzare per filtrazione con filtri da 0,22 µm. Dividere in aliquote da 1 mL e conservare a –20°C.

Ampicillina: stock

Composizione:	Ampicillina	0,15	g
	Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico sino a completa dissoluzione, sterilizzare per filtrazione con filtri da 0,22 µm. Dividere in aliquote da 1 mL e conservare a –20°C.

6.2.2. Analisi qualitativa e quantitativa
Le fasi operative (analisi qualitativa e quantitativa) sono uguali a quelle descritte per i colifagi somatici.

6.3. Ricerca dei batteriofagi (B40-8) del BACTEROIDES FRAGILIS
Il batterio rivelatore consigliato è il *Bacteroides fragilis* HSP 40.

6.3.1. Reagenti
Emina allo 0,1%

Composizione:	Idrossido di sodio	0,02	g
	Emina	0,1	g
	Acqua distillata	100	mL

Sciogliere su agitatore magnetico le pasticche di idrossido di sodio in acqua fino a completa dissoluzione (15' circa), aggiungere l'emina e lasciare in agitazione magnetica per circa 2 h fino a completa dissoluzione.
Sterilizzare per filtrazione (con filtri da 0,22 µm). Conservare a temperatura ambiente per non oltre sei mesi.

Carbonato di sodio 1M

Composizione:	Carbonato di sodio	105,99	g
	Acqua distillata	1	L

Sciogliere la polvere in acqua fino a completa dissoluzione, sterilizzare per filtrazione (con filtri da 0,22 µm). Conservare a temperatura ambiente per non oltre sei mesi.

Vancomicina: stock iniziale

Composizione:	Vancomicina	75	g
	Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico in acqua fino a completa dissoluzione, sterilizzare per filtrazione (con filtri da 0,22 µm). Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a –20 °C.

Kanamicina: stock iniziale

Composizione:	Kanamicina	1	g
	Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico in acqua fino a completa dissoluzione, sterilizzare per filtrazione (con filtri da 0,22 µm). Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a –20 °C.

Terreno di crescita:

Composizione:			
	Peptone di carne	10	g
	Caseitone	10	g
	Estratto di lievito	2	g
	Cloruro di sodio	5	g
	L cisteina monoidrato	0,5	g
	Cloruro di calcio biidrato (0,05 g mL^{-1})	1	mL
	Solfato di magnesio eptaidrato (0,12 g mL^{-1})	1	mL
	Glucosio	1	g
	Acqua distillata	1	L

Sterilizzare a 121°C per 15'.

Aggiungere successivamente:

Soluzione di emina allo 0,1% in idrossido di sodio 0,02% sterilizzata per filtrazione 10 mL

Soluzione di carbonato di sodio 1 M sterilizzata per filtrazione 25 mL

Aggiustare il pH a 7 con acido cloridrico concentrato

Al terreno di coltura può essere aggiunto agar-agar nella proporzione variabile secondo l'uso: agar del primo strato 1,5%; Agar molle 0.5%.

Per evitare contaminazioni è consigliabile aggiungere al terreno 100 mg per mL di solfato di Kanamicina e 7,5 mg per mL di Vancomicina. Il batterio raccomandato è resistente ad entrambi gli antibiotici.

Date le caratteristiche anaerobiche del batterio è necessario lavorare in condizioni di assoluta anaerobiosi. Per l'isolamento del fago su terreno agarizzato è necessario utilizzare, per l'incubazione, delle giare per anaerobi, diversamente le colture in terreno liquido possono essere effettuate utilizzando provette con tappo a vite completamente riempite.

6.3.2. Analisi quantitativa

Il protocollo proposto è uguale a quello già descritto per i colifagi e gli F+ specifici eccetto che per l'incubazione effettuata in giare per anaerobiosi.

Dopo 18÷20 ore di incubazione vengono contate le placche di lisi che si manifestano come aree circolari trasparenti nel contesto del terreno opacizzato per effetto della crescita batterica. Ognuna di queste placche corrisponde ad una particella di fago infettivo.

Il risultato viene espresso in UFP (Unità Formanti Placca) per volume di campione analizzato.

Bibliografia

DEBARTOLOMEIS J., CABELLI V.J. (1991), *Evaluation of an Escherichia coli host strain for enumeration of F-male-specific bacteriophages*. App.Environ.Microbiol. 57:1301.

DIVIZIA M., DONIA D., GABRIELI R., RUSCIO V., PANA' A. (1997), *Valutazioni relative ad un nuovo sistema di ultrafiltrazione per la concentrazione di enterovirus e batteriofagi*. Igiene e Sanità Pubblica. 53: 315.

DONIA D., DIVIZIA M., PANA' A. (1998), *Analysis of concentration methods for bacteriophages*. Igiene Moderna . 109: 1.

DONIA D., DIVIZIA M., PANÀ A., GABRIELI R., GASBARRO M., CAPUANI L.,MORELLI A.L. (1999), *Presence of bacteriophages in different stages of wastewater treatment*. Ig. Mod. 111, 1-13.

GABRIELI R., DIVIZIA M., DONIA D., RUSCIO V., BONADONNA L., DIOTALLEVI C., VILLA L., MANZONE G., PANÀ A. (1997), *Evaluation of the wastewater treatment plant of Rome airport*. Water Sci. Tech. 35, 193-196.

HAVELAAR A.H. (1993), *Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment*. ASM News, 59: 614.

TARTERA C., JOFRE J.(1987), *Bacteriophages active against Bacteroides fragilis in sewage-polluted waters*. Applied and Environmental Microbiology, 53, 1632.

TARTERA C., ARAUJO R., MICHEL T., JOFRE J. (1992), *Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting Bacteroides fragilis in sewage*. Applied and Environmental Microbiology , 58, 2670.

00A3632

DOMENICO CORTESANI, *direttore*

FRANCESCO NOCITA, *redattore*
ALFONSO ANDRIANI, *vice redattore*

(3651371/1) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.

ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO

LIBRERIE CONCESSIONARIE PRESSO LE QUALI È IN VENDITA LA GAZZETTA UFFICIALE

ABRUZZO

◇ **CHIETI**
LIBRERIA PIROLA MAGGIOLI - DE LUCA
Via A. Herio, 21

◇ **L'AQUILA**
LIBRERIA LA LUNA
Viale Persichetti, 9/A

◇ **PESCARA**
LIBRERIA COSTANTINI DIDATTICA
Corso V. Emanuele, 146
LIBRERIA DELL'UNIVERSITÀ
Via Galilei (ang. via Gramsci)

◇ **SULMONA**
LIBRERIA UFFICIO IN
Circonv. Occidentale, 10

◇ **TERAMO**
LIBRERIA DE LUCA
Via Riccitelli, 6

BASILICATA

◇ **MATERA**
LIBRERIA MONTEMURRO
Via delle Beccherie, 69
GULLIVER LIBRERIE
Via del Corso, 32

◇ **POTENZA**
LIBRERIA PAGGI ROSA
Via Pretoria

CALABRIA

◇ **CATANZARO**
LIBRERIA NISTICÒ
Via A. Daniele, 27

◇ **COSENZA**
LIBRERIA DOMUS
Via Monte Santo, 70/A

◇ **PALMI**
LIBRERIA IL TEMPERINO
Via Roma, 31

◇ **REGGIO CALABRIA**
LIBRERIA L'UFFICIO
Via B. Buozzi, 23/A/B/C

◇ **VIBO VALENTIA**
LIBRERIA AZZURRA
Corso V. Emanuele III

CAMPANIA

◇ **ANGRI**
CARTOLIBRERIA AMATO
Via dei Goti, 11

◇ **AVELLINO**
LIBRERIA GUIDA 3
Via Vasto, 15
LIBRERIA PIROLA MAGGIOLI
Via Matteotti, 30-32
CARTOLIBRERIA CESA
Via G. Nappi, 47

◇ **BENEVENTO**
LIBRERIA LA GIUDIZIARIA
Via F. Paga, 11
LIBRERIA MASONE
Viale Rettori, 71

◇ **CASERTA**
LIBRERIA GUIDA 3
Via Caduti sul Lavoro, 29-33

◇ **CASTELLAMMARE DI STABIA**
LINEA SCUOLA
Via Raiola, 69/D

◇ **CAVA DEI TIRRENI**
LIBRERIA RONDINELLA
Corso Umberto I, 253

◇ **ISCHIA PORTO**
LIBRERIA GUIDA 3
Via Sogliuzzo

◇ **NAPOLI**
LIBRERIA LEGISLATIVA MAJOLO
Via Caravita, 30
LIBRERIA GUIDA 1
Via Portalba, 20-23
LIBRERIA L'ATENEO
Viale Augusto, 168-170
LIBRERIA GUIDA 2
Via Merliani, 118
LIBRERIA I.B.S.
Salita del Casale, 18

◇ **NOCERA INFERIORE**
LIBRERIA LEGISLATIVA CRISCUOLO
Via Fava, 51;

◇ **NOLA**
LIBRERIA EDITRICE LA RICERCA
Via Fonseca, 59

◇ **POLLA**
CARTOLIBRERIA GM
Via Crispi

◇ **SALERNO**
LIBRERIA GUIDA
Corso Garibaldi, 142

EMILIA-ROMAGNA

◇ **BOLOGNA**
LIBRERIA GIURIDICA CERUTI
Piazza Tribunali, 5/F
LIBRERIA PIROLA MAGGIOLI
Via Castiglione, 1/C
GIURIDICA EDINFORM
Via delle Scuole, 38

◇ **CARPI**
LIBRERIA BULGARELLI
Corso S. Cabassi, 15

◇ **CESENA**
LIBRERIA BETTINI
Via Vescovado, 5

◇ **FERRARA**
LIBRERIA PASELLO
Via Canonica, 16-18

◇ **FORLÌ**
LIBRERIA CAPPELLI
Via Lazzaretto, 51
LIBRERIA MODERNA
Corso A. Diaz, 12

◇ **MODENA**
LIBRERIA GOLIARDICA
Via Berengario, 60

◇ **PARMA**
LIBRERIA PIROLA PARMA
Via Farini, 34/D

◇ **PIACENZA**
NUOVA TIPOGRAFIA DEL MAINO
Via Quattro Novembre, 160

◇ **RAVENNA**
LIBRERIA GIURIDICA DI FERMANI MAURIZIO
Via Corrado Ricci, 12

◇ **REGGIO EMILIA**
LIBRERIA MODERNA
Via Farini, 1/M

◇ **RIMINI**
LIBRERIA DEL PROFESSIONISTA
Via XXII Giugno, 3

FRIULI-VENEZIA GIULIA

◇ **GORIZIA**
CARTOLIBRERIA ANTONINI
Via Mazzini, 16

◇ **PORDENONE**
LIBRERIA MINERVA
Piazzale XX Settembre, 22/A

◇ **TRIESTE**
LIBRERIA TERGESTE
Piazza Borsa, 15 (gall. Tergesteo)

◇ **UDINE**
LIBRERIA BENEDETTI
Via Mercatovecchio, 13
LIBRERIA TARANTOLA
Via Vittorio Veneto, 20

LAZIO

◇ **FROSINONE**
LIBRERIA EDICOLA CARINCI
Piazza Madonna della Neve, s.n.c.

◇ **LATINA**
LIBRERIA GIURIDICA LA FORENSE
Viale dello Statuto, 28-30

◇ **RIETI**
LIBRERIA LA CENTRALE
Piazza V. Emanuele, 8

◇ **ROMA**
LIBRERIA ECONOMICO GIURIDICA
Via S. Maria Maggiore, 121
LIBRERIA DE MIRANDA
Viale G. Cesare, 51/E-F-G
LIBRERIA EDITALIA
Via dei Prefetti, 16 (Piazza del Parlamento)
LIBRERIA LAURUS ROBUFFO
Via San Martino della Battaglia, 35
LIBRERIA L'UNIVERSITARIA
Viale Ippocrate, 99
LIBRERIA IL TRITONE
Via Tritone, 61/A
LIBRERIA MEDICHINI
Via Marcantonio Colonna, 68-70
LA CONTABILE
Via Tuscolana, 1027

◇ **SORA**
LIBRERIA PIROLA MAGGIOLI
Via Abruzzo, 4

◇ **TIVOLI**
LIBRERIA MANNELLI
Viale Mannelli, 10

◇ **VITERBO**
LIBRERIA ''AR''
Palazzo Uffici Finanziari - Loc. Pietrare
LIBRERIA DE SANTIS
Via Venezia Giulia, 5

LIGURIA

◇ **CHIAVARI**
CARTOLERIA GIORGINI
Piazza N.S. dell'Orto, 37-38

◇ **GENOVA**
LIBRERIA GIURIDICA DI A. TERENGHI & DARIO CERIOLI
Galleria E. Martino, 9

◇ **IMPERIA**
LIBRERIA PIROLA MAGGIOLI - DI VIALE
Viale Matteotti, 43/A-45

LOMBARDIA

◇ **BERGAMO**
LIBRERIA LORENZELLI
Via G. D'Alzano, 5

◇ **BRESCIA**
LIBRERIA QUERINIANA
Via Trieste, 13

◇ **BRESSO**
LIBRERIA CORRIDONI
Via Corridoni, 11

◇ **BUSTO ARSIZIO**
CARTOLIBRERIA CENTRALE BORAGNO
Via Milano, 4

◇ **COMO**
LIBRERIA GIURIDICA BERNASCONI
Via Mentana, 15

◇ **GALLARATE**
LIBRERIA PIROLA MAGGIOLI
Via Pulicelli, 1 (ang. p. risorgimento)
LIBRERIA TOP OFFICE
Via Torino, 8

◇ **LECCO**
LIBRERIA PIROLA - DI LAZZARINI
Corso Mart. Liberazione, 100/A

◇ **LIPOMO**
EDITRICE CESARE NANI
Via Statale Briantea, 79

◇ **LODI**
LA LIBRERIA S.a.s.
Via Defendente, 32

◇ **MANTOVA**
LIBRERIA ADAMO DI PELLEGRINI
Corso Umberto I, 32

◇ **MILANO**
LIBRERIA CONCESSIONARIA IPZS-CALABRESE
Galleria V. Emanuele II, 13-15
FOROBONAPARTE S.r.l.
Foro Bonaparte, 53

◇ **MONZA**
LIBRERIA DELL'ARENGARIO
Via Mapelli, 4

◇ **PAVIA**
LIBRERIA GALASSIA
Corso Mazzini, 28

◇ **SONDRIO**
LIBRERIA MAC
Via Caimi, 14

◇ **VARESE**
LIBRERIA PIROLA - DI MITRANO
Via Albuzzi, 8

Segue: **LIBRERIE CONCESSIONARIE PRESSO LE QUALI È IN VENDITA LA GAZZETTA UFFICIALE**

MARCHE

◇ **ANCONA**
LIBRERIA FOGOLA
Piazza Cavour, 4-5-6

◇ **ASCOLI PICENO**
LIBRERIA PROSPERI
Largo Crivelli, 8

◇ **MACERATA**
LIBRERIA UNIVERSITARIA
Via Don Minzoni, 6

◇ **PESARO**
LIBRERIA PROFESSIONALE MARCHIGIANA
Via Mameli, 34

◇ **S. BENEDETTO DEL TRONTO**
LA BIBLIOFILA
Via Ugo Bassi, 38

MOLISE

◇ **CAMPOBASSO**
LIBRERIA GIURIDICA DI.E.M.
Via Capriglione, 42-44
CENTRO LIBRARIO MOLISANO
Viale Manzoni, 81-83

PIEMONTE

◇ **ALBA**
CASA EDITRICE I.C.A.P.
Via Vittorio Emanuele, 19

◇ **ALESSANDRIA**
LIBRERIA INTERNAZIONALE BERTOLOTTI
Corso Roma, 122

◇ **BIELLA**
LIBRERIA GIOVANNACCI
Via Italia, 14

◇ **CUNEO**
CASA EDITRICE ICAP
Piazza dei Galimberti, 10

◇ **NOVARA**
EDIZIONI PIROLA E MODULISTICA
Via Costa, 32

◇ **TORINO**
CARTIERE MILIANI FABRIANO
Via Cavour, 17

◇ **VERBANIA**
LIBRERIA MARGAROLI
Corso Mameli, 55 - Intra

◇ **VERCELLI**
CARTOLIBRERIA COPPO
Via Galileo Ferraris, 70

PUGLIA

◇ **ALTAMURA**
LIBRERIA JOLLY CART
Corso V. Emanuele, 16

◇ **BARI**
CARTOLIBRERIA QUINTILIANO
Via Arcidiacono Giovanni, 9
LIBRERIA PALOMAR
Via P. Amedeo, 176/B
LIBRERIA LATERZA GIUSEPPE & FIGLI
Via Sparano, 134
LIBRERIA FRATELLI LATERZA
Via Crisanzio, 16

◇ **BRINDISI**
LIBRERIA PIAZZO
Corso Garibaldi, 38/A

◇ **CERIGNOLA**
LIBRERIA VASCIAVEO
Via Gubbio, 14

◇ **FOGGIA**
LIBRERIA PATIERNO
Via Dante, 21

◇ **LECCE**
LIBRERIA LECCE SPAZIO VIVO
Via Palmieri, 30

◇ **MANFREDONIA**
LIBRERIA IL PAPIRO
Corso Manfredi, 126

◇ **MOLFETTA**
LIBRERIA IL GHIGNO
Via Campanella, 24

◇ **TARANTO**
LIBRERIA FUMAROLA
Corso Italia, 229

SARDEGNA

◇ **CAGLIARI**
LIBRERIA F.LLI DESSÌ
Corso V. Emanuele, 30-32

◇ **ORISTANO**
LIBRERIA CANU
Corso Umberto I, 19

◇ **SASSARI**
LIBRERIA MESSAGGERIE SARDE
Piazza Castello, 11
LIBRERIA AKA
Via Roma, 42

SICILIA

◇ **ACIREALE**
LIBRERIA S.G.C. ESSEGICI S.a.s.
Via Caronda, 8-10
CARTOLIBRERIA BONANNO
Via Vittorio Emanuele, 194

◇ **AGRIGENTO**
TUTTO SHOPPING
Via Panoramica dei Templi, 17

◇ **CALTANISSETTA**
LIBRERIA SCIASCIA
Corso Umberto I, 111

◇ **CASTELVETRANO**
CARTOLIBRERIA MAROTTA & CALIA
Via Q. Sella, 106-108

◇ **CATANIA**
LIBRERIA LA PAGLIA
Via Etnea, 393
LIBRERIA ESSEGICI
Via F. Riso, 56
LIBRERIA RIOLO FRANCESCA
Via Vittorio Emanuele, 137

◇ **GIARRE**
LIBRERIA LA SENORITA
Corso Italia, 132-134

◇ **MESSINA**
LIBRERIA PIROLA MESSINA
Corso Cavour, 55

◇ **PALERMO**
LIBRERIA S.F. FLACCOVIO
Via Ruggero Settimo, 37
LIBRERIA FORENSE
Via Maqueda, 185
LIBRERIA S.F. FLACCOVIO
Piazza V. E. Orlando, 15-19
LIBRERIA MERCURIO LI.CA.M.
Piazza S. G. Bosco, 3
LIBRERIA DARIO FLACCOVIO
Viale Ausonia, 70
LIBRERIA CICALA INGUAGGIATO
Via Villaermosa, 28
LIBRERIA SCHOOL SERVICE
Via Galletti, 225

◇ **S. GIOVANNI LA PUNTA**
LIBRERIA DI LORENZO
Via Roma, 259

◇ **SIRACUSA**
LA LIBRERIA DI VALVO E SPADA
Piazza Euripide, 22

◇ **TRAPANI**
LIBRERIA LO BUE
Via Cascio Cortese, 8
LIBRERIA GIURIDICA DI SAFINA
Corso Italia, 81

TOSCANA

◇ **AREZZO**
LIBRERIA PELLEGRINI
Via Cavour, 42

◇ **FIRENZE**
LIBRERIA PIROLA «già Etruria»
Via Cavour, 46/R
LIBRERIA MARZOCCO
Via de' Martelli, 22/R
LIBRERIA ALFANI
Via Alfani, 84-86/R

◇ **GROSSETO**
NUOVA LIBRERIA
Via Mille, 6/A

◇ **LIVORNO**
LIBRERIA AMEDEO NUOVA
Corso Amedeo, 23-27
LIBRERIA IL PENTAFOGLIO
Via Fiorenza, 4/B

◇ **LUCCA**
LIBRERIA BARONI ADRI
Via S. Paolino, 45-47
LIBRERIA SESTANTE
Via Montanara, 37

◇ **MASSA**
LIBRERIA IL MAGGIOLINO
Via Europa, 19

◇ **PISA**
LIBRERIA VALLERINI
Via dei Mille, 13

◇ **PISTOIA**
LIBRERIA UNIVERSITARIA TURELLI
Via Macallè, 37

◇ **PRATO**
LIBRERIA GORI
Via Ricasoli, 25

◇ **SIENA**
LIBRERIA TICCI
Via delle Terme, 5-7

◇ **VIAREGGIO**
LIBRERIA IL MAGGIOLINO
Via Puccini, 38

TRENTINO-ALTO ADIGE

◇ **TRENTO**
LIBRERIA DISERTORI
Via Diaz, 11

UMBRIA

◇ **FOLIGNO**
LIBRERIA LUNA
Via Gramsci, 41

◇ **PERUGIA**
LIBRERIA SIMONELLI
Corso Vannucci, 82
LIBRERIA LA FONTANA
Via Sicilia, 53

◇ **TERNI**
LIBRERIA ALTEROCCA
Corso Tacito, 29

VENETO

◇ **BELLUNO**
LIBRERIA CAMPDEL
Piazza Martiri, 27/D

◇ **CONEGLIANO**
LIBRERIA CANOVA
Via Cavour, 6/B

◇ **PADOVA**
LIBRERIA DIEGO VALERI
Via Roma, 114

◇ **ROVIGO**
CARTOLIBRERIA PAVANELLO
Piazza V. Emanuele, 2

◇ **TREVISO**
CARTOLIBRERIA CANOVA
Via Calmaggiore, 31

◇ **VENEZIA**
CENTRO DIFFUSIONE PRODOTTI
EDITORIALI I.P.Z.S.
S. Marco 1893/B - Campo S. Fantin

◇ **VERONA**
LIBRERIA L.E.G.I.S.
Via Adigetto, 43
LIBRERIA GROSSO GHELFI BARBATO
Via G. Carducci, 44
LIBRERIA GIURIDICA EDITRICE
Via Costa, 5

◇ **VICENZA**
LIBRERIA GALLA 1880
Corso Palladio, 11

MODALITÀ PER LA VENDITA

La «Gazzetta Ufficiale» e tutte le altre pubblicazioni ufficiali sono in vendita al pubblico:

— presso l'Agenzia dell'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato in ROMA: piazza G. Verdi, 10;

— presso le Librerie concessionarie indicate nelle pagine precedenti.

Le richieste per corrispondenza devono essere inviate all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - Direzione Marketing e Commerciale - Piazza G. Verdi, 10 - 00100 Roma, versando l'importo, maggiorato delle spese di spedizione, a mezzo del c/c postale **n. 16716029.** Le inserzioni, come da norme riportate nella testata della parte seconda, si ricevono con pagamento anticipato, presso le agenzie in Roma e presso le librerie concessionarie.

PREZZI E CONDIZIONI DI ABBONAMENTO - 2000

Gli abbonamenti annuali hanno decorrenza dal 1° gennaio e termine al 31 dicembre 2000
i semestrali dal 1° gennaio al 30 giugno 2000 e dal 1° luglio al 31 dicembre 2000

PARTE PRIMA - SERIE GENERALE E SERIE SPECIALI
Ogni tipo di abbonamento comprende gli indici mensili

Tipo A - Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi tutti i supplementi ordinari:
- annuale ..... **L. 508.000**
- semestrale ..... **L. 289.000**

Tipo A1 - Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i supplementi ordinari contenenti i provvedimenti legislativi:
- annuale ..... **L. 416.000**
- semestrale ..... **L. 231.000**

Tipo A2 - Abbonamento ai supplementi ordinari contenenti i provvedimenti non legislativi:
- annuale ..... **L. 115.500**
- semestrale ..... **L. 69.000**

Tipo B - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti dei giudizi davanti alla Corte costituzionale:
- annuale ..... **L. 107.000**
- semestrale ..... **L. 70.000**

Tipo C - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti delle Comunità europee:
- annuale ..... **L. 273.000**
- semestrale ..... **L. 150.000**

Tipo D - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata alle leggi ed ai regolamenti regionali:
- annuale ..... **L. 106.000**
- semestrale ..... **L. 68.000**

Tipo E - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata ai concorsi indetti dallo Stato e dalle altre pubbliche amministrazioni:
- annuale ..... **L. 267.000**
- semestrale ..... **L. 145.000**

Tipo F - *Completo.* Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i supplementi ordinari contenenti i provvedimenti legislativi e non legislativi ed ai fascicoli delle quattro serie speciali (ex tipo F):
- annuale ..... **L. 1.097.000**
- semestrale ..... **L. 593.000**

Tipo F1 - Abbonamento ai fascicoli della serie generale inclusi i supplementi ordinari contenenti i provvedimenti legislativi ed ai fascicoli delle quattro serie speciali (escluso il tipo A2):
- annuale ..... **L. 982.000**
- semestrale ..... **L. 520.000**

Integrando con la somma di **L. 150.000** *il versamento relativo al tipo di abbonamento della* Gazzetta Ufficiale - *parte prima - prescelto, si riceverà anche l'Indice repertorio annuale cronologico per materie 1999.*

Prezzo di vendita di un fascicolo separato della *serie generale*	L.	1.500
Prezzo di vendita di un fascicolo separato delle *serie speciali I, II e III*, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.500
Prezzo di vendita di un fascicolo della *IV serie speciale «Concorsi ed esami»*	L.	2.800
Prezzo di vendita di un fascicolo *indici mensili,* ogni 16 pagine o frazione	L.	1.500
Supplementi ordinari per la vendita a fascicoli separati, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.500
Supplementi straordinari per la vendita a fascicoli, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.500

Supplemento straordinario «Bollettino delle estrazioni»

Abbonamento annuale	L.	162.000
Prezzo di vendita di un fascicolo, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.500

Supplemento straordinario «Conto riassuntivo del Tesoro»

Abbonamento annuale	L.	105.000
Prezzo di vendita di un fascicolo separato	L.	8.000

Gazzetta Ufficiale su MICROFICHES - 2000
(Serie generale - Supplementi ordinari - Serie speciali)

Abbonamento annuo (52 spedizioni raccomandate settimanali)	L.	1.300.000
Vendita singola: ogni microfiches contiene fino a 96 pagine di Gazzetta Ufficiale	L.	1.500
Contributo spese per imballaggio e spedizione raccomandata (da 1 a 10 microfiches)	L.	4.000

N.B. — Per l'estero i suddetti prezzi sono aumentati del 30%.

PARTE SECONDA - INSERZIONI

Abbonamento annuale	L.	474.000
Abbonamento semestrale	L.	283.000
Prezzo di vendita di un fascicolo, ogni 16 pagine o frazione	L.	1.550

I prezzi di vendita, in abbonamento ed a fascicoli separati, per l'estero, *nonché quelli di vendita dei fascicoli delle* annate arretrate, *compresi i fascicoli dei supplementi ordinari e straordinari, sono* raddoppiati.

L'importo degli abbonamenti deve essere versato sul c/c postale **n. 16716029** intestato all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato. L'invio dei fascicoli disguidati, che devono essere richiesti entro 30 giorni dalla data di pubblicazione, è subordinato alla trasmissione dei dati riportati sulla relativa fascetta di abbonamento.

Per informazioni, prenotazioni o reclami attinenti agli abbonamenti oppure alla vendita della *Gazzetta Ufficiale* bisogna rivolgersi direttamente all'Amministrazione, presso l'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - Piazza G. Verdi, 10 - 00100 ROMA

Ufficio abbonamenti	Vendita pubblicazioni	Ufficio inserzioni	Numero verde
☎ 06 85082149/85082221	☎ 06 85082150/85082276	☎ 06 85082146/85082189	☎ 800-864035

* 4 1 1 2 5 0 0 0 8 7 0 0 0 *

L. 22.500